

Funktion und Mechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase

Philipps



Universität
Marburg

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps Universität Marburg
vorgelegt von

Daniel Horst Knack

Master of Science

aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis Januar 2013 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 01.03.2013 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung am 04.03.2013

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind in zwei Originalarbeiten veröffentlicht:

Knack, D. H.; Hagel, C.; Szaleniec, M.; Dudzik, A.; Salwinski, A.; Heider, J. (2012). Substrate and Inhibitor Spectra of Ethylbenzene Dehydrogenase: Perspectives on Application Potential and Catalytic Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* 78(18): 6475-6482.

Knack, D. H.; Marshall, J. L.; Harlow, G. P.; Dudzik, A.; Szaleniec, M.; Liu, S.-Y.; Heider, J. (2013) BN/CC Isosteric Compounds as Enzyme Inhibitors: *N*- and *B*-ethyl-1,2-azaborine Inhibit Ethylbenzene Hydroxylation as Non-convertible Substrate Analogs. *Angewandte Chemie International Edition* 52(9): 2599-2601.

Weitere unveröffentlichte Originalarbeiten:

Dudzik, A.; Kozik, B.; Tataruch, M.; Knack, D.H.; Borowski, T.; Heider, J.; Witko, M.; Szaleniec, M. The Reaction Mechanism of Stereoselective Hydroxylation of *p*-OH and *p*-NH₂ Substituted Alkylaromatic Compounds by Ethylbenzene Dehydrogenase. *Canadian Journal of Chemistry*. (in Überarbeitung)

Für meine Familie

Für Agnieszka

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung.....	8
Summary.....	10
Einleitung.....	12
1. Kohlenwasserstoffe.....	12
2. Aerober Abbau von Kohlenwasserstoffen	13
3. Anaerober Abbau von Kohlenwasserstoffen	14
4. Anaerober Abbau von Alkanen	14
5. Anaerober Abbau von Ethylbenzol.....	16
6. Molybdäenenzyme.....	17
7. Die Dimethylsulfoxidreduktase (DMSOR) Familie der Molybdäenenzyme	18
8. Ethylbenzol Dehydrogenase (EbDH).....	19
9. EbDH-ähnliche Enzyme.....	22
Schwerpunkte der Untersuchungen	23
Materialien und Methoden	24
1. Geräte.....	24
2. Chemikalien und Gase.....	25
3. Kulturmedien, Lösungen und Puffer.....	25
4. Sonstige Materialien	25
5. Biochemikalien und Molekularbiologie	25
6. Enzyme.....	26
7. Vektoren	26
8. Längen- und Molekulargewichtstandards.....	26
9. Oligonukleotide	27
10. Organismen	28
Methoden	29
1. Software- und Internetanwendungen	29
2. Mikrobiologische Methoden	29
2.1 Herstellung von Medien für die anaerobe Kultivierung	29
2.2 Kultivierung von <i>Aromatoleum aromaticum</i>	30
2.3 Kultivierung von <i>Desulfococcus oleovorans</i>	31
2.4 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	33

2.5 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	33
2.6 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.7 Überproduktion von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	34
3. Molekularbiologische Methoden	35
3.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Aromatoleum aromaticum</i> ...	35
3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	35
3.3 Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	36
3.6 Modifikation von DNA nach dem StarGate® (IBA) System.....	36
3.7 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	39
3.8 DNA Sequenzierung	40
4. Biochemische Methoden.....	40
4.1 Herstellung von Zellextrakt aus <i>A. aromaticum</i>	40
4.2 Herstellung von Zellextrakt aus <i>D. oleovorans</i>	40
4.3 Reinigung der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	41
4.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE.....	42
4.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	42
4.6 Konzentrierung von Proteinen	43
4.7 Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	43
4.8 Bestimmung der Enzymaktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase ..	44
4.9 Bestimmung von enzymkinetischen Parametern	45
4.10 Enzymatischer Umsatz von EbDH Substraten.....	46
5. Analytische Methoden.....	47
5.1 Chromatographische und Massenspektrometrische Analyse von enzymatischen Produkten	47
5.2 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	48
5.3. NMR Analyse von Syntheseprodukten	48
6. Chemische Methoden	48
6.1 Synthese von spezifisch deuteriertem Ethylbenzol.....	48
6.2 Destillation von Syntheseprodukten	50
Ergebnisse	52
3. Untersuchungen zum Anwendungspotential der Ethylbenzol Dehydrogenase	55
3.1 Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität ...	55
3.2 Kaliumferricyanid als alternativer Elektronenakzeptor	57
4. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase	58
4.1 Ermittlung der Enzymkinetik.....	58
4.2 Untersuchung der Enantioselektivität der C-H Spaltung.....	61

4.3. Untersuchung einer möglichen Alken-Hydrataseaktivität der EbDH	65
5. Anaerober Abbau von Alkanen in <i>Desulfococcus oleovorans</i>	67
5.1 Analyse von Alkan-induzierten Proteinen und Wachstumsversuche auf möglichen Stoffwechselintermediaten	67
5.2 <i>In silico</i> Analyse des Ethylbenzol Dehydrogenase-ähnlichen Enzyms aus <i>D. oleovorans</i> und Vergleich mit anderen Molybdäenzymen	69
5.3 Klonierung der Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms aus <i>D. oleovorans</i>	71
Diskussion	73
1. Mechanismus und Funktion der Ethylbenzol Dehydrogenase	73
2. Anwendungspotential der Ethylbenzol Dehydrogenase	81
3. Anaerober Abbau von Alkanen in <i>Desulfococcus oleovorans</i>	83
Literaturverzeichnis	90
Anhang	96
Danksagung	103
Curriculum Vitae	104
Erklärung	105

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturdarstellung einiger häufig vorkommender Kohlenwasserstoffe.....	12
Abb. 2: Schematischer Vergleich des anaeroben Alkanabbaus in sulfatreduzierenden Bakterien.....	15
Abb. 3: Initialreaktionen des anaeroben Ethylbenzolabbaus in sulfatreduzierenden und denitrifizierenden Bakterien.....	16
Abb. 4: Schematische Darstellung des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol in <i>Aromatoleum aromaticum</i>	17
Abb. 5: Struktur von Molybdopterin, dem gemeinsamen Cofaktor aller mononukleären Molybdän- und Wolframenzyme.....	18
Abb. 6: Struktur der Ethylbenzol Dehydrogenase und ihres aktiven Zentrums.....	21
Abb. 7: Vektorkarte des Donorvektors pEntry-IBA20.....	37
Abb. 8: Flussdiagramm Fusion Cloning.....	39
Abb. 9: Syntheseweg von (S)-[1- ² H ₁]Ethylbenzol.....	49
Abb. 10: Syntheseweg von (R)-[1- ² H ₁]Ethylbenzol.....	50
Abb. 11: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener organischer Lösungsmitteln auf die Aktivität der EbDH.....	81
Abb. 12: Extinktionen unterschiedlicher Konzentrationen von Ethylbenzol und Ferriceniumtetrafluoroborat in wässriger Lösung.....	83
Abb. 13: Doppelt reziproker Auftrag von Enzymaktivitäten von 3-Phenyl-1-Propen und 3-Phenyl-1-Propin in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von Ferriceniumtetrafluoroborat und Ferricyanid.....	87
Abb. 14: Erwartete Produkte des enzymatischen Umsatzes von Ethylbenzol, [2H ₁₀]- Ethylbenzol, (R)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol und (S)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol mit EbDH.....	90
Abb. 15: Getestete Alken- bzw. Alkinverbindungen zur Untersuchung der vermuteten Hydrataseaktivität der EbDH.....	92
Abb. 16: Wachstumskurven von <i>D. oleovorans</i> Kulturen auf unterschiedlichen Kohlenwasserstoffsubstraten.....	93
Abb. 17: SDS-PAGE Analyse von <i>D. oleovorans</i> Zellextrakt.....	94
Abb. 18: Phylogenetischer Stammbaum der α-Untereinheiten von 60 Molybdänenzymen aus der DMSO Reduktase Familie.....	96
Abb. 19: Alignment der Aminosäuresequenzen von α-Untereinheiten ausgewählter Mitglieder des Subtyps II der DMSO Reduktase Familie.....	97

Abb. 20: Vektorkarten der Vektoren in die die Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms aus <i>D. oleovorans</i> kloniert wurden.....	98
Abb. 21: Postulierter Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	101
Abb. 22: Strukturansicht von Ethylbenzol im aktiven Zentrum der EbDH.....	102
Abb. 23: Mögliches kinetisches Model der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	107
Abb. 24: Postulierter anaerober Alkanabbauweg in <i>D. oleovorans</i>	111
Abb. 25: Schematischer Vergleich der Organisation der Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms aus <i>D. oleovorans</i> , der EbDH aus <i>A. aromaticum</i> EbN1 und des alternativen Komplex III aus <i>Rhodothermus marinus</i> sowie deren genomischen Kontext.....	113
Abb. 26: Schematisches Model der möglichen Funktion des EbDH-ähnlichen Enzyms aus <i>D. oleovorans</i>	114
Abb. 27: Nicht-linearer Auftrag von Enzymaktivitäten von Ethylbenzol, 3-Phenyl-1-Propen und 3-Phenyl-1-Propin in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen Ferriceniumtetrafluoroborat und Kaliumferricyanid.....	122
Abb. 28: Nicht-linearer Auftrag von Enzymaktivitäten von 3-Phenyl-1-Propen und 3-Phenyl-1-Propin in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen Ferriceniumtetrafluoroborat und Kaliumferricyanid.....	123
Abb. 29: NMR Spektren der Fraktionen die durch die Destillation des Reaktionsgemischs von (S)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol erhalten wurden.....	125
Abb. 30: NMR Spektren der Fraktionen die durch die Destillation des Reaktionsgemischs von (R)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol erhalten wurden.....	126
Abb. 31: Massenspektren der Produkte der enzymatischen Umsetzung von Ethylbenzol, (R)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol und (S)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol.....	127

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.....	26
Tab. 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Organismen.....	28
Tab. 3: Vergleich der apparenten enzymkinetischen Parameter von Ferriceniumtetrafluoroborat und Kaliumferricyanid mit verschiedenen Kohlenwasserstoffsubstraten.....	84
Tab. 4: Enzymkinetische Parameter für das Ping-Pong Model.....	86
Tab. 5: Enzymkinetische Parameter für das Ternärkomplex-Model.....	86
Tab. 6: Massenspektrometrische Analyse von Umsetzungen der synthetisierten deuterierten Ethylbenzole mit EbDH.....	90
Tab. 7: Enzymaktivitäten und kinetische Isotopeneffekte (KIE) der deuterierten Ethylbenzolderivate im Vergleich zu undeutertem Ethylbenzol und vollständig deutertem Ethylbenzol ($[^2\text{H}_{10}]$ -Ethylbenzol).....	91
Tab. 8: Analyse der induzierten Proteine der auf Hexadecan kultivierten <i>D. oleovorans</i> Kulturen.....	94
Tab. 9: Vergleich von theoretischen und experimentell bestimmten Enzymaktivitäten bzw. kinetischen Isotopeneffekte der deuterierten Ethylbenzolderivate.....	104
Tab. 10: Enzymaktivitäten der Ethylbenzol Dehydrogenase mit Ethylbenzol unter Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen organischen Lösungsmitteln.....	121
Tab. 11: Vergleich von apparenten enzymkinetischen Parametern von 3-Phenyl-1-propen und 3-Phenyl-1-propin in Abhängigkeit von Ferriceniumtetrafluoroborat und Kaliumferricyanid.....	124
Tab. 12: Vergleich von apparenten und realen enzymkinetischen Parametern von 3- Phenyl-1-propen und 3-Phenyl-1-propin.....	124

Abkürzungsverzeichnis

Die im Text verwendeten Abkürzungen entsprechen den Standardabkürzungen des *European Journal of Biochemistry*. Davon abweichende Abkürzungen sind hier aufgeführt.

ad	addieren (lat.: zu, auf etwas hin)
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CDCl ₃	deutiertes Chloroform
DAD	Diode array detector
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DFT	Dichtefunktionaltheorie
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ε	Extinktionskoeffizient
EI	Elektronenstoßionisation
et al.	et alli (lat.: und andere)
FID	Flammenionisationsdetektor
lac	Lactose
MWCO	Molecular weight cut-off
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
OD _n	optische Dichte bei n nm
QM:MM	Quantenmechanik:Molekülmechanik
RE	Restriktionsendonuklease
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
T _M	Melting Temperature
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
v/v	Volume Per Volume
Vol.	Volumen
w/v	Weight Per Volume

Zusammenfassung

Typische Initialreaktionen anaerober Kohlenwasserstoffabbauwege sind die Hydroxylierung von Ethylbenzol und die Addition von Fumarat an Toluol oder Alkane. Die Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-Phenylethanol leitet den anaeroben Abbau von Ethylbenzol in denitrifizierenden Bakterien wie *Aromatoleum aromaticum* ein. Diese sauerstoffunabhängige und stereospezifische Reaktion wird katalysiert durch die Ethylbenzol Dehydrogenase (EbDH), ein Molybdän/Eisen-Schwefel/Häm-Enzym aus der DMSO Reduktase Familie. Der anaerobe Abbau von Toluol in denitrifizierenden Bakterien wie *Thauera aromatica* und der anaerobe Abbau von Alkanen in den meisten sulfatreduzierenden Bakterien wird dagegen durch die Addition von Fumarat an die Methylgruppe von Toluol bzw. an das C2 Atom der Alkane eingeleitet.

Ziel dieser Arbeit war es den Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase weiter aufzuklären sowie Untersuchungen zum Anwendungspotential des Enzyms durchzuführen. Außerdem wurden die ersten Untersuchungen zur Identifizierung eines neuartigen anaeroben Alkanabbauweges in dem sulfatreduzierenden Bakterium *Desulfococcus oleovorans* durchgeführt.

I.) Die EbDH wurde in den letzten Jahren biochemisch charakterisiert und Anhand der Kinetik von Substraten und chemoinformatischen Berechnungen ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen. In der vorliegenden Dissertation wurden enzymkinetische Untersuchungen mit alternativen Substraten und Inhibitoren durchgeführt, mit denen weitere Daten zur Bestätigung des postulierten Reaktionsmechanismus erhalten wurden. Das spezifische Verhalten bzw. die Kinetik der Substrate und Inhibitoren sowie die Natur der Hydroxylierungsprodukte der Substrate geben einen starken Hinweis auf die Existenz der vermuteten Radikal- und Carbokation-Intermediate im katalytischen Mechanismus des Enzyms. So wurde festgestellt, dass die Natur und Position bestimmter Substituenten am benzyllischen Ring der Substrate die Reaktivität mit der EbDH positiv und negativ beeinflussen können, indem sie die vermuteten Radikal- und/oder Carbokation-Intermediate stabilisieren oder destabilisieren. Die inhibitorische Wirkung von anderen Substratanaloga geht dagegen auf deren Unreaktivität mit der EbDH zurück. Offenbar kann mit diesen Inhibitoren die Energiebarriere zur Bildung der Radikal- und/oder Carbokation-Intermediate nicht überwunden werden. Zudem konnte in dieser Arbeit eine neuartige Klasse von Inhibitoren in Form von BN-CC Isosteren von Ethylbenzol identifiziert werden. In diesen Verbindungen sind jeweils zwei C-Atome des aromatischen Rings durch ein Bor- und ein Stickstoff-Atom ersetzt, was zu isosterischen und isoelektronischen Verbindungen führt (Azaborine). Diese Untersuchungen zeigen zum ersten Mal, dass künstliche Azaborin-Derivate von organischen Verbindungen biologische Aktivität aufweisen und erbringen daher

den Nachweis des Konzepts der BN-CC Isosterie zu neuartigen Verbindungen mit neuartigen Eigenschaften führen kann.

Eine weitere Untersuchung in dieser Arbeit war die Bestimmung der Enantioselektivität der Wasserstoffabspaltung vom C1 Atom des Ethylsubstituenten von Ethylbenzol als initialem Schritt des Reaktionsmechanismus. Dazu wurden spezifisch deuterierte Ethylbenzolderivate synthetisiert, die am C1 Atom des Ethylsubstituenten jeweils ein Deuteriumatom an Stelle eines Wasserstoffatoms in (*S*)- oder (*R*)-Konfiguration tragen. Mit enzymkinetischen Untersuchungen wurden kinetische Isotopeneffekte gemessen werden, die darauf hinweisen, dass wie für den initialen Schritt des Reaktionsmechanismus postuliert, der *pro(S)* Wasserstoff abgespalten wird.

Zur Bestimmung des kinetischen Modells des Reaktionsmechanismus der EbDH wurden enzymkinetische Untersuchungen mit zwei ausgewählten Substraten und zwei ausgewählten artifiziellen Elektronenakzeptoren durchgeführt. Die Auswertung der Daten ergab, dass das Enzym höchstwahrscheinlich einem Ping-Pong Mechanismus folgt.

II.) Das breite Substratspektrum und die hohe Stereoselektivität der Produktbildung machen die EbDH zu einem interessanten Kandidaten für eine biotechnologische Anwendung. In der vorliegenden Dissertation wurden daher Untersuchungen zum Anwendungspotential des Enzyms durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich das Additiv Polyethylenglykol 400 sehr gut zur Stabilisierung des Enzyms in wässriger Lösung eignet und durch die Hinzugabe dieses Stoffes auch die Löslichkeit der EbDH Substrate erhöht werden kann. Weiter wurde Kaliumferricyanid als alternativer Elektronenakzeptor identifiziert, der eine hohe Stabilität und Löslichkeit aufweist und daher für einen technischen Prozess gut geeignet ist.

III.) Das sulfatreduzierende Bakterium *Desulfococcus oleovorans* verwendet für den anaeroben Alkanabbau keine Fumarat-Additionsreaktion wie andere bekannte alkanabbauende Mikroorganismen, sondern eine unbekannte Initialreaktion. Zur Identifizierung dieser Initialreaktion wurde *D. oleovorans* in der vorliegenden Dissertation mit Alkanen bzw. Fettsäuren als Kohlenstoff- und Elektronenquelle anaerob kultiviert und mit dem Zellextrakt der Kulturen proteomische Analysen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass drei Proteine ausschließlich in den Kulturen, die auf Alkanen gewachsen waren, induziert sind. Eine massenspektrometrische Analyse dieser induzierten Proteinbanden ergab, dass es sich dabei um die drei Untereinheiten eines Ethylbenzol Dehydrogenase-ähnlichen Enzyms handelt. Die Aminosäuresequenz dieses Enzyms zeigt eine hohe Sequenzidentität zur Ethylbenzol Dehydrogenase. Aus diesem Grund wird postuliert, dass der Alkanabbau in *D. oleovorans* durch eine sauerstoffunabhängige Hydroxylierung der Alkane initiiert wird.

Summary

Typical initial reactions of anaerobic hydrocarbon degradation pathways are the hydroxylation of ethylbenzene and the addition of fumarate to toluene and to alkanes. The hydroxylation of ethylbenzene to (S)-phenylethanol initiates the anaerobic degradation of ethylbenzene in denitrifying bacteria like *Aromatoleum aromaticum*. This oxygen-independent and stereospecific reaction is catalyzed by ethylbenzene dehydrogenase (EbDH), a molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme of the DMSO reductase family. In contrast, the anaerobic degradation of toluene in denitrifying bacteria like *Thauera aromatica* and the anaerobic degradation of alkanes in most of the sulphate-reducing bacteria is initiated by the addition of fumarate to the methyl-group of toluene and to the C2 atom of alkanes, respectively.

The aim of this work was the further elucidation of the reaction mechanism of ethylbenzene dehydrogenase and investigations on the enzymes application potential. Furthermore, first investigations on the identification of a novel anaerobic alkane degradation pathway in the sulphate-reducing bacterium *Desulfococcus oleovorans* were performed.

I.) EbDH was characterized biochemically within the last years and based on kinetic studies of substrates and computational chemistry approaches, a reaction mechanism was proposed. In the present work further enzyme kinetic studies with alternative substrates and inhibitors were performed which support the proposed reaction mechanism. The specific characteristics and kinetics of the substrates and inhibitors, respectively, and the nature of the hydroxylation products of the substrates, provide strong indication for the existence of the proposed radical- and carbocation-intermediate species in the catalytic mechanism of the enzyme. The results show that nature and position of specific substituents on the benzylic ring of substrates influences the reactivity with EbDH in a positive or negative way by stabilizing or destabilizing the proposed radical and/or carbocation intermediates. In contrast, the inhibitory effect of other substrate analogs can be ascribed to their inactivity with EbDH. Obviously, the energy barriers for the formation of the radical- and/or the carbocation-intermediates cannot be overcome with those compounds. In addition, in this work a novel class of inhibitors, which are BN-CC isosteres of ethylbenzene, was identified. In these compounds, two carbon atoms of the aromatic ring are substituted by a boron and a nitrogen atom which leads to isosteric and isoelectronic compounds. The investigations show for the first time that artificial azaborine derivatives of organic compounds have a biochemical reactivity and provide the proof of concept that BN-CC isosterism can lead to novel compounds with novel properties.

A further study of this work was the determination of the enantioselectivity of the hydrogen abstraction from the C1 atom of the ethyl-substituent of ethylbenzene as the initial step of the reaction mechanism. In doing so, specific deuterated ethylbenzene derivatives were synthesized which carry a deuterium atom instead of a hydrogen atom on the C1 atom, either in (*S*) or (*R*) configuration. With kinetic investigations, specific kinetic isotope effects were determined which indicate that the *pro(S)* hydrogen atom is abstracted by the enzyme in the initial step of the reaction.

For the determination of the kinetic model of the EbDH reaction mechanism, enzyme kinetic investigations with two specific substrates and two specific artificial electron acceptors were performed. The evaluation of the data revealed that the enzyme follows most likely a Ping Pong mechanism.

II.) The broad substrate spectrum and the high stereospecificity for product formation make EbDH an interesting candidate for a biotechnological application. In the present work, investigations on the application potential of the enzyme were performed. In doing so, it was observed that the additive compound polyethylene glycol 400 is suitable for the stabilization of the enzyme in an aqueous environment and for the increasement of the solubility of EbDH substrates. Furthermore, potassium ferricyanide was identified as alternative electron acceptor which shows a high stability and solubility and therefore is suitable for the implementation in an industrial process.

III.) The sulphate-reducing bacterium *Desulfococcus. oleovorans* uses not a fumarate addition reaction as initial step of anaerobic alkane degradation, as other alkane-degrading microorganism do, but a so far unknown reaction. For the identification of this reaction, *D. oleovorans* was grown anaerobically on alkanes and fatty acids as carbon and electron donor. With cell free extract of these cultures, proteomic analyses were performed. It was observed that three proteins were exclusively induced in the cultures grown on alkanes. The analysis of the induced proteins by mass spectrometry showed that the proteins are the subunits of an ethylbenzene dehydrogenase-like enzyme. The amino acid sequence of the enzyme shows a high sequence identity to ethylbenzene dehydrogenase. For this reason, it is proposed that anaerobic alkane degradation in *D. oleovorans* is initiated by an oxygen-independent hydroxylation of alkanes.

Einleitung

1. Kohlenwasserstoffe

Kohlenwasserstoffe (Abb. 1) gehören zu den am häufigsten vorkommenden Stoffgruppen in der Natur und entstehen hauptsächlich durch die geologische Transformation von organischer Materie in der Erdkruste oder durch biosynthetische Prozesse von Pflanzen und Mikroorganismen. Die größten Quellen von Kohlenwasserstoffen sind fossile Energieträger wie Erdöl, Erdgas und Kohle die seit Millionen Jahren in großer Menge gebildet werden. Seit dem Beginn der Industrialisierung vor ca. 150 Jahren gelangt eine immer größere Menge dieser Verbindungen durch die Förderung von fossilen Energieträgern und deren Verarbeitung in die Natur und dient sowohl als Energieträger als auch als Ausgangsstoff für chemische und pharmazeutische Produkte. Die Hauptbestandteile von Erdöl, einem der wichtigsten fossilen Energieträger, sind aliphatische Kohlenwasserstoffe (gesättigt=Alkane; ungesättigt=Alkene, Alkine) und aromatischen Kohlenwasserstoffen (Arene), sowie einige anorganische Verbindungen wie Schwefel, Stickstoff und Sauerstoff. Wichtige Quellen für Arene sind außer den fossilen Energieträgern das pflanzliche Polymer Lignin, pflanzliche Sekundärstoffe und die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Allen Kohlenwasserstoffen gemeinsam ist das sie überwiegend aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen aufgebaut sind und in der Regel gar keine oder nur sehr wenige funktionelle Gruppen besitzen, was sie relativ inert gegenüber chemischen Reaktionen macht (Abb. 1). Vor allem die Arene sind aufgrund ihres aromatischen Rings mit seinem sehr stabilen konjugierten und delokalisierten π -Elektronensystem sehr reaktionsträge. Aufgrund dieser Eigenschaften, und der damit einhergehenden hohen Resonanzenergie, reagiert der

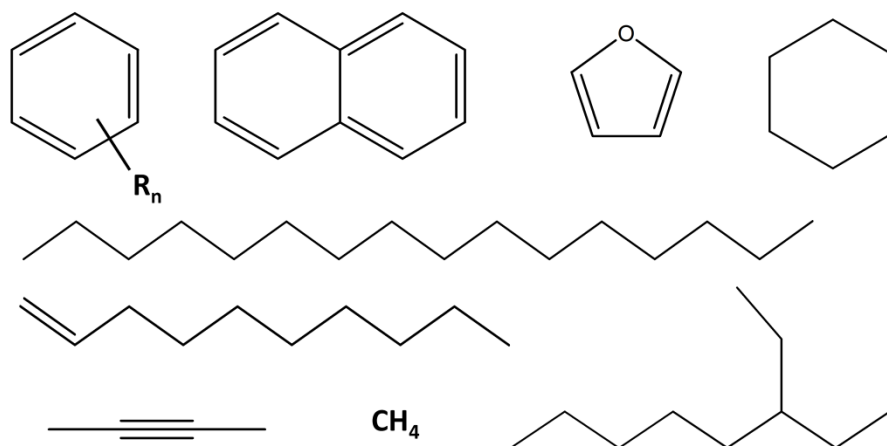


Abb.1: Strukturdarstellung einiger häufig vorkommender Kohlenwasserstoffe. Von links nach rechts: Benzol und substituierte Derivate (BTEX Gruppe), Naphthalin, Furan, Cyclohexan, Hexadecan, 1-Hexadecen, 2-Butin, Methan, 3-Ethyloctan.

aromatische Ring mit anderen Verbindungen nur unter Zufuhr von hohen Energiemengen. Dies gelingt in der organischen Chemie nur durch den Einsatz starker Reduktionsmittel (Dearomatisierung durch Birch-Reduktion; Birch et al., 1980; Heider und Fuchs, 1997) oder den Einsatz starker Lewis-Säuren als Katalysatoren (elektrophile Substitution, z.B. durch Friedel-Crafts-Alkylierung). Anders als Alkane und Alkene sind viele aromatische Kohlenwasserstoffe toxisch für den Menschen (z.B. BTEX Gruppe: Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylene; PAK: polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Naphthalin und Anthracen). Der Grad der Toxizität richtet sich dabei nach den Abbauprozessen dieser Verbindungen im menschlichen Körper. Toluol und Ethylbenzol werden biologisch abgebaut, indem die aliphatischen Substituenten enzymatisch angegriffen und die Stoffe bis zur Benzoesäure oxidiert werden, welche leicht ausgeschieden werden kann. Dagegen entstehen bei der enzymatischen Oxidation von Benzol sehr reaktive Epoxidverbindungen, die das Erbgut schädigen und krebserregend wirken.

2. Aerober Abbau von Kohlenwasserstoffen

Trotz der Reaktionsträgheit von Kohlenwasserstoffen sind Mikroorganismen in der Lage diese zu metabolisieren, d.h. als Kohlenstoff- und/oder Elektronenquelle zu nutzen. Dies geschieht sowohl durch aerobe als auch anaerobe Prozesse, also in Anwesenheit oder Abwesenheit von molekularem Sauerstoff. Die Stoffwechselwege des aeroben Abbaus von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen sind in vielen Bakterienarten (z.B. *Pseudomonas* spp.) sowie Pilzen (z.B. Ascomyceten) gut untersucht (Heider und Fuchs, 1997; Van Beilen et al., 2003; Wentzel et al., 2007; Pérez-Pantoja et al., 2010; Fuchs et al., 2011). Die Initialreaktionen dieser Abbaupfade werden von Monooxygenasen und Dioxygenasen unter Verwendung von molekularem Sauerstoff als Cosubstrat katalysiert. Diese Enzyme führen dabei ein (Monooxygenasen) oder zwei Sauerstoffatome (Dioxygenasen) in das Kohlenwasserstoffgrundgerüst ein, um dieses zu oxidieren bzw. eine funktionelle Gruppe zu bilden. Bei der von Monooxygenasen katalysierten Reaktion im aeroben Abbaupfad von Alkanen wird das Kohlenwasserstoffgrundgerüst zunächst zu einem Alkohol hydroxyliert und dann in weiteren Schritten zu einem Aldehyd oder Keton bis hin zu einer Fettsäure oxidiert, die über die β -Oxidation abgebaut wird (Van Beilen et al., 2003; Wentzel et al., 2007). Analog dazu können alkylsubstituierte Arene an ihren Substituenten hydroxyliert und oxidiert werden. Im aeroben Abbaupfad von Alkenen und unsubstituierten Arenen durch Monooxygenasen wird die ungesättigte Bindung des Substrates im ersten Schritt epoxidiert und das Epoxid anschließend mit Wasser zu einem Diol hydrolysiert (Small und Ensign, 1997; Fuchs et al., 2011). Nach der weiteren Oxidation bis zur Fettsäure kann der Abbau über die β -Oxidation erfolgen. Bei den Arenen muss zuvor noch eine oxidative Ringspaltung durch eine Dioxygenase erfolgen (Heider und Fuchs, 1997; Pérez-Pantoja et

al., 2010; Fuchs et al., 2011). Bei einer ausschließlich von Dioxygenasen katalysierten Reaktion findet eine direkte Hydroxylierung der Arene ohne Epoxidintermediat zu einem Diol statt (Gibson und Parales, 2000; Pérez-Pantoja et al., 2010; Fuchs et al., 2011). Auch hier muss eine oxidative Ringspaltung durch eine zweite Dioxygenase erfolgen, damit das dann lineare Kohlenstoffgrundgerüst über die β -Oxidation abgebaut werden kann.

3. Anaerober Abbau von Kohlenwasserstoffen

Alle aeroben Initialreaktionen haben die Gemeinsamkeit, dass sie das reaktionsträge Kohlenwasserstoffgrundgerüst durch Einführung von Sauerstoff als Teil einer funktionellen Gruppe für den weiteren Abbau verfügbar machen. Aus diesem Grund dachte man lange Zeit, dass ein mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen ohne Sauerstoff (anaerob) unmöglich ist, da Sauerstoff in weiten Teilen der Natur (Tiefsee, tiefere Sedimentschichten) nicht vorkommt. In den letzten 20 Jahren wurde jedoch festgestellt, dass auch in anoxischen Bereichen Kohlenwasserstoffe von anaeroben Mikroorganismen abgebaut werden (Heider et al., 1998; Spormann und Widdel, 2000; Widdel und Rabus, 2001; Widdel und Grundmann, 2010), und viele dieser Mikroorganismen identifiziert und charakterisiert. (Aeckersberg et al., 1991; Lovley et al., 1993; Rabus et al., 1993; Rueter et al., 1994; Rabus und Widdel, 1995; So und Young, 1999; Ehrenreich et al., 2000). Zu diesen Bakterien gehören u.a. denitrifizierende Betaproteobakterien der Gattungen *Thauera* und *Azoarcus*, sulfatreduzierende Deltaproteobakterien der Gattungen *Desulfobacula*, *Desulfococcus* und *Desulfatibacillum*, andere Deltaproteobakterien der Gattungen *Geobacter* sowie einige phototrophe Bakterien und methanogene Konsortien (Heider, 2007). Da diese Mikroorganismen keinen Sauerstoff als Cosubstrat nutzen können, müssen sie neue und völlig andere Stoffwechselwege und Enzyme als aerobe Mikroorganismen besitzen. Einige dieser neuartigen und ungewöhnlichen Abbauewege konnten in den letzten Jahren aufgeklärt und viele der daran beteiligten Enzyme identifiziert und charakterisiert werden (Heider, 2007; Tierney und Young, 2010; Widdel und Grundmann, 2010). Typische Initialreaktionen dieser anaeroben Abbauewege sind Fumaratadditionen, Carboxylierungen, sauerstoffunabhängige Hydroxylierungen und reverse Methanogenese (Boll et al., 2002; Heider, 2007; Fuchs et al., 2011).

4. Anaerober Abbau von Alkanen

Im Gegensatz zum anaeroben Abbau von Arenen wie Toluol und Ethylbenzol sind über den anaeroben Abbau von Alkanen erst in den vergangenen 10 Jahren wichtige Erkenntnisse erlangt worden. Bisher wurden denitrifizierende und sulfatreduzierende Bakterienarten sowie methanogene Archaeen identifiziert, die vor allem langkettige Alkane (C₆-C₂₀) anaerob

metabolisieren können (Aeckersberg et al., 1991; Heider et al., 1998; So und Young, 1999; Zengler et al., 1999; Ehrenreich et al., 2000; Spormann und Widdel, 2000). Erst kürzlich wurden zudem Bakterien beschrieben die kurzketzige Alkane unter sulfatreduzierenden Bedingungen metabolisieren (Kniemeyer et al., 2007). Die Initialreaktion des anaeroben Abbaus von langkettigen Alkanen in dem denitrifizierenden Stamm HxN1, dem sulfatreduzierenden Deltaproteobakterium *Desulfatibacillum* spp., und den meisten anderen beschriebenen alkanabbauenden Organismen, ist die Addition von Fumarat an das C2 Atom der Alkankette (Rabus et al., 2001; Callaghan et al., 2006; Heider, 2007; Widdel und Grundmann, 2010; Jarling et al., 2012). Diese Reaktion wird katalysiert durch das Enzym Alkylsuccinatsynthase, ein Glycylradikalenzym des Benzylsuccinatsynthase-Typs (Leuthner et al., 1998; Leutwein und Heider, 1999; Callaghan et al., 2008; Grundmann et al., 2008). Die Addition von Fumarat an ein Kohlenwasserstoffmolekül wurde erstmals für den anaeroben Toluolabbau in denitrifizierenden Bakterien bzw. für den anaeroben Ethylbenzolabbau in sulfatreduzierenden Bakterien als Initialreaktion beschrieben (siehe Einleitung Kapitel 5). Ein weiterer Vertreter der bisher beschriebenen anaeroben alkanabbauenden Mikroorganismen, das sulfatreduzierende Bakterium *Desulfococcus oleovorans* Stamm Hxd3, besitzt jedoch keinen Gencluster für eine Alkylsuccinatsynthase in seinem Genom. Des Weiteren produziert *D. oleovorans* beim Wachstum auf Alkanen ein anderes Fettsäuremuster als seine Verwandten *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01 und *Desulfatibacillum aliphaticivorans* Stamm CV2803T die über eine Alkylsuccinatsynthase verfügen (Abb. 2). So

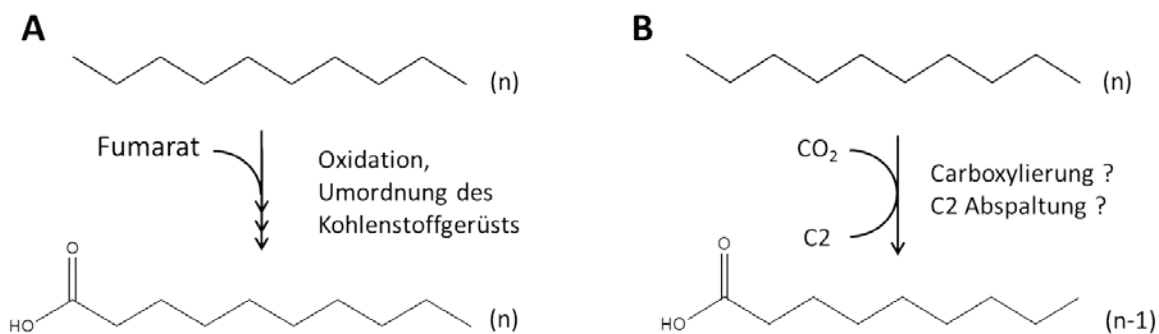


Abb. 2: Schematischer Vergleich des anaeroben Alkanabbaus in sulfatreduzierenden Bakterien
A: *Desulfatibacillum alkenivorans*; B: *Desulfococcus oleovorans*. Für Details siehe Text.

produziert *D. oleovorans* Hxd3 geradkettige Fettsäuren wenn er auf ungeradkettigen Alkanen kultiviert wird und umgekehrt (Aeckersberg et al., 1998; So et al., 2003). *D. alkenivorans* und *D. aliphaticivorans* produzieren jedoch immer Fettsäuren mit der gleichen Kettenlänge wie die der Alkane auf denen sie kultiviert werden (So und Young, 1999). Aufgrund dieser Tatsache und dem Fehlen einer Alkylsuccinatsynthase in *D. oleovorans* muss dieses Bakterium einen anderen Abbauweg bzw. eine andere Initialreaktion für den anaeroben

Alkanabbau besitzen als *D. alkenivorans* und *D. aliphaticivorans* und andere Vertreter mit Alkylsuccinatsynthase.

5. Anaerober Abbau von Ethylbenzol

Der anaerobe Abbau von Ethylbenzol wurde bisher für denitrifizierende und sulfatreduzierende Bakterien beschrieben (Rabus und Widdel, 1995; Ball et al., 1996; Rabus und Heider, 1998; Johnson und Spormann, 1999; Spormann und Widdel, 2000; Kniemeyer et al., 2003). Der anaerobe Abbauweg und die Initialreaktion in denitrifizierenden Bakterien und sulfatreduzierenden Bakterien unterscheiden sich jedoch voneinander (Abb. 3). Die Initialreaktion des anaeroben Abbaus in sulfatreduzierenden Bakterien wie dem Stamm EbS7 ist die Addition von Fumarat an das C1 Atom des Ethylsubstituenten von Ethylbenzol die vermutlich durch ein Glycylradikalenzym des Benzylsuccinatsynthase-Typs katalysiert wird (Kniemeyer et al., 2003). Diese Reaktion ist analog zur Initialreaktion des anaeroben Toluolabbaus in denitrifizierende Bakterien wie *Thauera aromatica* (Leuthner et al., 1998; Leutwein und Heider, 1999; Boll et al., 2002; Heider, 2007; Fuchs et al., 2011) und analog zum anaeroben Alkanabbau in sulfatreduzierenden Bakterien wie *Desulfatibacillum* und denitrifizierende Bakterien wie dem Betaproteobakterien-Stamm HxN1 (Ehrenreich et al., 2000; Rabus et al., 2001; Grundmann et al., 2008). Der anaerobe Abbau von Ethylbenzol in denitrifizierenden Bakterien wurde in den letzten Jahren vor allem für den Modellorganismus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 bzw. *Azoarcus* spp. Stamm EB-1 beschrieben (Rabus und Widdel, 1995; Ball et al., 1996; Rabus und Heider, 1998; Johnson und Spormann, 1999). Die Initialreaktion dieses Abbauweges ist die stereospezifische, sauerstoffunabhängige Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol, die durch das Molybdän/Eisen-Schwefel/Häm-Enzym Ethylbenzol Dehydrogenase (EbDH) katalysiert wird (Johnson und Spormann, 1999; Johnson et al., 2001; Kniemeyer und Heider, 2001; Rabus et al., 2002). Anschließend erfolgt die Oxidation von (S)-1-Phenylethanol durch eine

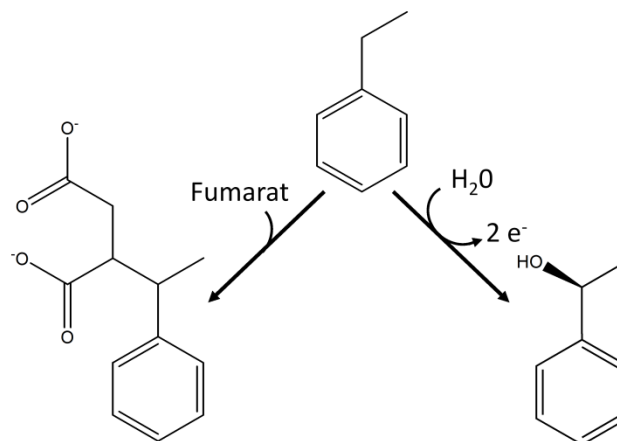


Abb. 3: Initialreaktionen des anaeroben Ethylbenzolabbaus in sulfatreduzierenden (links) und denitrifizierenden (rechts) Bakterien. Für Details siehe Text.

(S)-1-Phenylethanoldehydrogenase zu Acetophenon (Höffken et al., 2005) welches in einem weiteren Schritt durch eine Acetophenoncarboxylase zu Benzoylacetat carboxyliert wird (Rabus et al., 2002; Jobst et al., 2010). Schließlich findet eine Aktivierung dieses beta-oxo-Intermediats zu einem Coenzym A (CoA) Thioester und eine thiolytische Spaltung in Acetyl-CoA und Benzoyl-CoA sowie der weitere Abbau von Benzoyl-CoA über den gemeinsamen Abbauweg des anaeroben Aromatenabbaus statt (Heider et al., 1998; Boll et al., 2002; Fuchs et al., 2011; Abb. 4).

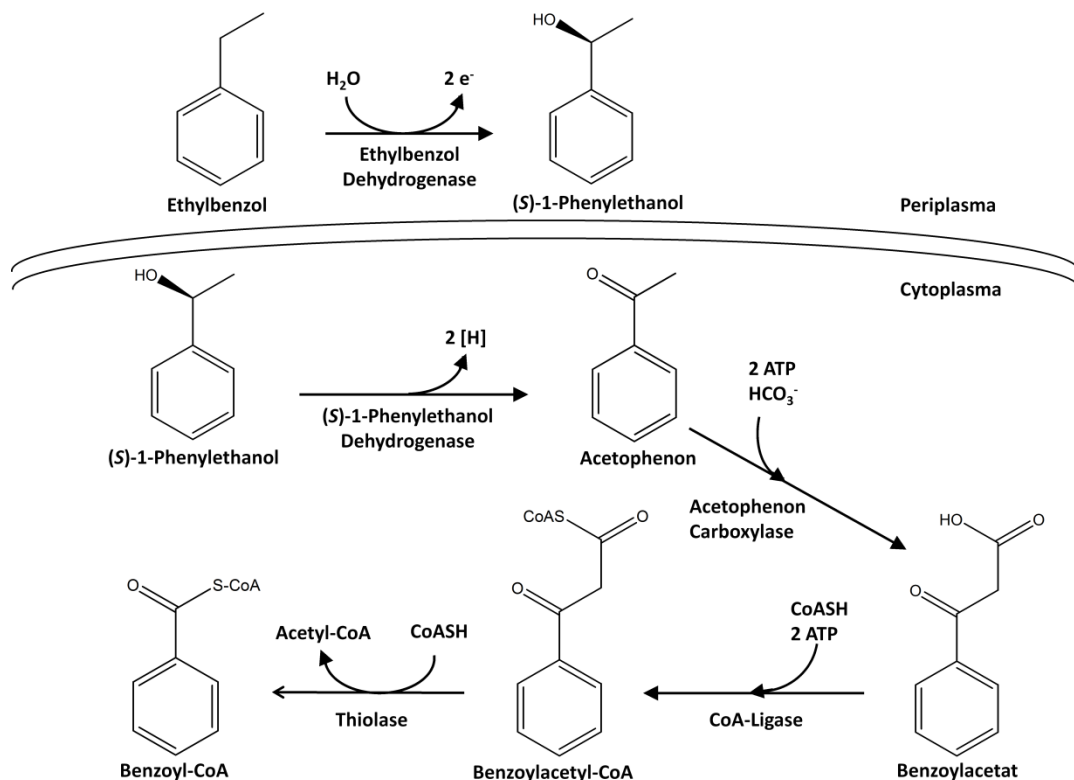


Abb. 4: Schematische Darstellung des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol in *Aromatoleum aromaticum*. Für Details siehe Text. 1: Ethylbenzol; 2: (S)-1-Phenylethanol; 3: Acetophenon; 4: Benzoylacetat; 5: Benzoylacetyl-CoA; 6: Benzoyl-CoA; 7: Acetyl-CoA.

6. Molybdänenzyme

Molybdän ist ein Übergangsmetall welches in biologischen Systemen als Cofaktor von Enzymen auftritt. Es ist redoxaktiv und kann in drei unterschiedlichen Redoxzuständen vorliegen (+IV, +V und +VI), wodurch es sowohl Ein-Elektronentransfers als auch Zwei-Elektronentransfers bewerkstelligen kann. Mit Ausnahme des Enzyms Nitrogenase, wo Molybdän als Teil eines Molybdän-Eisen-Schwefel-Clusters auftritt, enthalten alle Molybdänenzyme das Molybdän als Teil eines Metall-organischen Cofaktors (Molybdäncofaktor; MoCo), wobei je nach Enzym ein Mo durch ein oder zwei Molybdopterine (auch Pyranopterin, Abb. 5), koordiniert ist. Molybdänenzyme sind weit verbreitet in

biologischen Systemen und wurden in allen Domänen des Lebens gefunden. Die unterschiedlichen Enzyme werden je nach Definition (zusammen mit ihren Wolfram enthaltenden Pendants) in vier Familien eingeteilt: I.) Xanthinoxidase Familie, II.) Sulfitoxidase Familie, III.) Dimethylsulfoxid (DMSO) Reduktase Familie und IV.) Aldehyd Ferredoxin Oxidoreduktase Familie (AOR) (Kisker et al. 1998). Mit einer möglichen Ausnahme enthalten alle Mitglieder der AOR Familie in ihrem aktiven Zentrum an Stelle des Molybdänatoms ein Wolframatom. Aufgrund der ähnlichen Elektronenkonfiguration von Molybdän und Wolfram ist die biologische Aktivität des Wolframcofaktors allerdings im

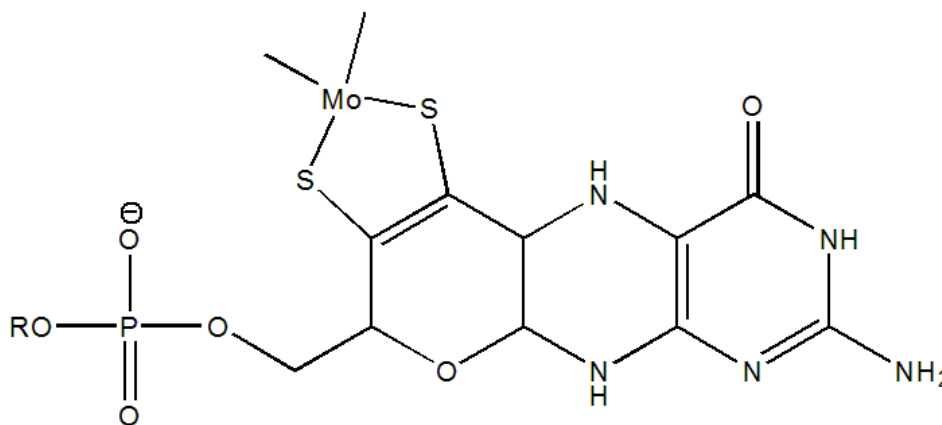


Abb. 5: Struktur von Molybdopterin, dem gemeinsamen Cofaktor aller mononukleären Molybdän- und Wolframenzyme. R=H, Monophosphatform; R=Guanindinukleotid, Molybdopterin-Guanindinukleotid (MGD); R=Cytosindinukleotid, Molybdopterin-Cytosindinukleotid (MCD).

Wesentlichen identisch mit der des Molybdäncofaktors. Wolframenzyme kommen vor allem in thermophilen Archaeen vor, in deren anoxischen Habitaten sich das niedrigere Redoxpotential von Wolfram vermutlich als physiologischer Vorteil erweist. Bei den von Molybdän- und Wolframenzymen katalysierten Reaktionen handelt es sich meistens um (formale) Sauerstofftransferreaktionen, bei denen Elektronen vom oder zum Substrat übertragen werden (Hille, 1996; Hille et al., 1998). Die Einteilung in die einzelnen Familien erfolgt jedoch nicht nach der katalysierten Reaktion, sondern anhand der Anzahl der Molybdopterine die das Molybdänatom koordinieren, der chemischen Struktur des Molybdopterins, der Aminosäureliganden die mit an der Koordination des Molybdänatoms beteiligt sind und nicht zuletzt der Aminosäuresequenz der Enzyme bzw. deren strukturellen Motive und Enzymuntereinheiten (Kisker et al., 1998; Romao, 2009).

7. Die Dimethylsulfoxidreduktase (DMSOR) Familie der Molybdänenzyme

Die DMSO Reduktase Familie ist eine sehr diverse Gruppe von Molybdänenzymen die fast ausschließlich Sauerstofftransferreaktionen katalysieren und die in Prokaryoten und Archaeen zu finden sind (McDevitt et al., 2002; Romao, 2009). In ihrer biologischen Funktion

können diese Enzyme sehr divers sein, da sie sowohl als primäre Dehydrogenasen (Substratoxidation, Gewinnung von Redoxäquivalenten) als auch als terminale Reduktasen (Anaerobe Atmung, Energiegewinnung) auftreten. Den Mitgliedern dieser Familie ist gemein, dass das Molybdänatom des Molybdäncofaktors durch zwei substituierte Molybdopterine koordiniert wird (*bis*-Molybdopteringuanindinukleotid; *bis*MGD) während das Molybdänatom in den Enzymen der Xanthinoxidase- und Sulfitoxidase-Familie von einem Cytidin- oder Xanthosindinukleotid oder einem unsubstituierten Pterin koordiniert wird. Auch aufgrund der hohen Sequenzidentität ihrer Aminosäuren und der Konservierung von gemeinsamen Faltungsmustern können diese Enzyme in eine gemeinsame Familie eingruppiert werden. Die Mitglieder der DMSO Reduktase Familie treten als Monomere, Heterodimere oder Heterotrimere auf. Die α Untereinheiten der Dimere bzw. der Trimere entsprechen dabei den nativen Enzymen der monomeren Vertreter. Die zusätzlichen β und γ Untereinheiten der dimeren und trimeren Enzyme sind nicht an der Katalyse beteiligt sondern tragen Eisen-Schwefel-Cluster (β Untereinheiten) und oft Hämgruppen (γ Untereinheiten) für den Elektronentransport. Die γ Untereinheiten können zudem eine Funktion als Membrananker besitzen. Eine weitere Einteilung dieser Familie erfolgt aufgrund ihrer konservierten Faltungsmuster und Sequenzmotive und der gebundenen akzessorischen Cofaktoren nach McDevitt et al. (2002) in die Untergruppen I, II und III: Untergruppe I enthält ein konserviertes Cystein oder Selenocystein als Liganden des Mo-Atoms; darunter fallen die assimilatorische Nitratreduktase, periplasmatische Nitratreduktase, Formiat Dehydrogenase, Thiosulfatreduktase und Polysulfidreduktase. Untergruppe II enthält ein konserviertes Aspartat als Liganden des Mo-Atoms; darunter fallen die Dimethylsulfid Dehydrogenase, Selenatreduktase, Ethylbenzol Dehydrogenase und respiratorische Nitratreduktase. Untergruppe III enthält ein konserviertes Serin als Liganden des Mo-Atoms; darunter fallen die Trimethylamin *N*-oxidoreduktase, Dimethylsulfoxidreduktase und Biotinsulfoxidreduktase. Darüber hinaus haben McDevitt et al. (2002) die Gemeinsamkeiten insbesondere der Dimethylsulfid Dehydrogenase, der Selenatreduktase und der Ethylbenzol Dehydrogenase betont, weil diese Enzyme mit ihrer Elektronentransportkette auf der Ebene von Cytochromen des c-Typs bzw. von Cytochrom *bc*₁ Komplexen interagieren können. Das hohe Redoxpotential dieser terminalen Elektronenakzeptoren erlaubt es diesen Enzymen vermutlich erst, Reaktionen wie die Reduktion von Selenat oder die Oxidation von Ethylbenzol zu katalysieren.

8. Ethylbenzol Dehydrogenase (EbDH)

Die Ethylbenzol Dehydrogenase (EbDH, EC 1.17.99.2) ist ein Molybdän/Eisen-Schwefel/Häm-Enzym vom Typ II innerhalb der DMSO Reduktase Familie und katalysiert die sauerstoffunabhängige und stereospezifische Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-1-

Phenylethanol, die Initialreaktion des anaeroben Ethylbenzolabbaus in denitrifizierenden Bakterien wie *A. aromaticum*, *Azoarcus* spp. Stamm PbN1 oder *Azoarcus* spp. Stamm EB-1 (Johnson und Spormann, 1999; Johnson et al., 2001; Kniemeyer und Heider 2001). Innerhalb der DMSO Reduktase Familie ist das Enzym einzigartig da kein Enzym dieser Familie eine derartige Reaktion katalysiert. Zusammen mit der *p*-Cresolmethylhydroxylase ist die EbdH das einzige beschriebene Enzym, welches eine sauerstoffunabhängige Hydroxylierung einer Methylen- bzw. Methylgruppe katalysiert. (Hopper et al., 1991; Johnson et al., 2001; Kniemeyer und Heider, 2001). Das native Enzym ist ein Heterotrimer in einer $\alpha\beta\gamma$ Zusammensetzung und einer molekularen Masse von ca. 165 kDa (Abb. 6; Kloer et al., 2006). Die große α Untereinheit der EbdH (EbdA, 96 kDa) trägt den Molybdäncofaktor und einen [4Fe-4S] Cluster (FS0) und besitzt eine hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeit zur großen α Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase (NarG). Des Weiteren trägt sie eine Signalsequenz für den Twin-Arginine-Translocation (TAT) pathway, die für die Sekretion des nativen Enzyms ins Periplasma notwendig ist (im Gegensatz zur respiratorischen Nitratreduktase die an der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist). EbdA und NarG sind die einzigen Vertreter der Typ II DMSO Reduktasen, deren Struktur bisher aufgeklärt ist. Sie besitzen beide einen Aspartatrest als fünften Molybdänliganden sowie einen der beiden MGD Cofaktoren in einer unüblichen Konformation mit geöffnetem Pyranring. Die mittlere β Untereinheit der EbdH (EbdB, 43 kDa) trägt drei [4Fe-4S] Cluster (FS1-3) und einen [3Fe-4S] Cluster (FS4) die am Elektronentransport vom aktiven Zentrum zur kleinen γ Untereinheit beteiligt sind. Auch diese Untereinheit zeigt eine hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeit zu ihrem Pendant in der respiratorischen Nitratreduktase, NarH. Die kleine γ Untereinheit der EbdH (EbdC, 23 kDa) trägt ein Häm b_{559} als Cofaktor und zeigt keine Ähnlichkeit zu der kleinen Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase, wohl aber zu denen der anderen bekannten Enzyme vom Typ II. Es wird vermutet, dass EbdC die Elektronen, die vom oxidierten Substratmolekül über die Eisen-Schwefel-Cluster abtransportiert werden, aufnimmt und auf ein Cytochrom *c* überträgt, welches die Elektronen in die Atmungskette einspeist (Kniemeyer und Heider, 2001). Dann werden sie schließlich durch die respiratorische Nitratreduktase auf den terminalen Elektronenakzeptor Nitrat übertragen. Das hohe Redoxpotential des Häms der γ Untereinheit wird als notwendig erachtet, um Ethylbenzol irreversibel zu (S)-1-Phenylethanol zu oxidieren. In den letzten Jahren wurde das Substrat- und Inhibitorspektrum des Enzyms untersucht und die kinetischen Parametern der einzelnen Substrate bzw. Inhibitoren bestimmt (Szaleniec et al., 2007). Zusammen mit einem quantenchemischen Reaktionsmodell basierend auf der Struktur des Enzyms, wurde ein Reaktionsmechanismus für das Enzym vorgeschlagen (Szaleniec et al., 2006, 2007, 2008). Es wird angenommen, dass der initiale Schritt des katalytischen Mechanismus die Spaltung einer C-H Bindung am C1 Atom des

Ethylsubstituenten von Ethylbenzol ist, gleichzeitig mit dem Entzug eines Elektrons durch den Mo-Cofaktor. Anschließend wird auch das zweite Elektron abstrahiert. Das Molybdän wird dadurch vom Oxidationszustand +VI zu +IV reduziert, während aus dem Ethylbenzol ein Carbokationintermediat entsteht, welches unmittelbar durch einen nukleophilen Angriff einer gebundenen OH⁻ Gruppe am Molybdän zum Produkt (S)-1-Phenylethanol umgesetzt wird. Die drei Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase sind zusammen mit dem Gen für ein vermutliches Chaperon (EbdD; TorD-ähnlich) in einem Operon organisiert (Rabus, 2005). Chaperone dieses Typs sind für Molybdänenzyme der DMSO Reduktase Familie notwendig für den Cofaktoreinbau und die korrekte Faltung (Proteinreifung) sowie den Transport des Enzyms über den TAT-Pathway (Genest et al., 2009). Im Genom von *A. aromaticum* befindet sich noch ein weiteres Operon, welches paraloge Gene zum EbDH-Operon beherbergt und welches die Untereinheiten des Isoenzym EbDH2 kodiert (Rabus, 2005). Es ist bisher unbekannt, welche Funktion dieses Enzym hat oder unter welchen Bedingungen diese Gene exprimiert werden.

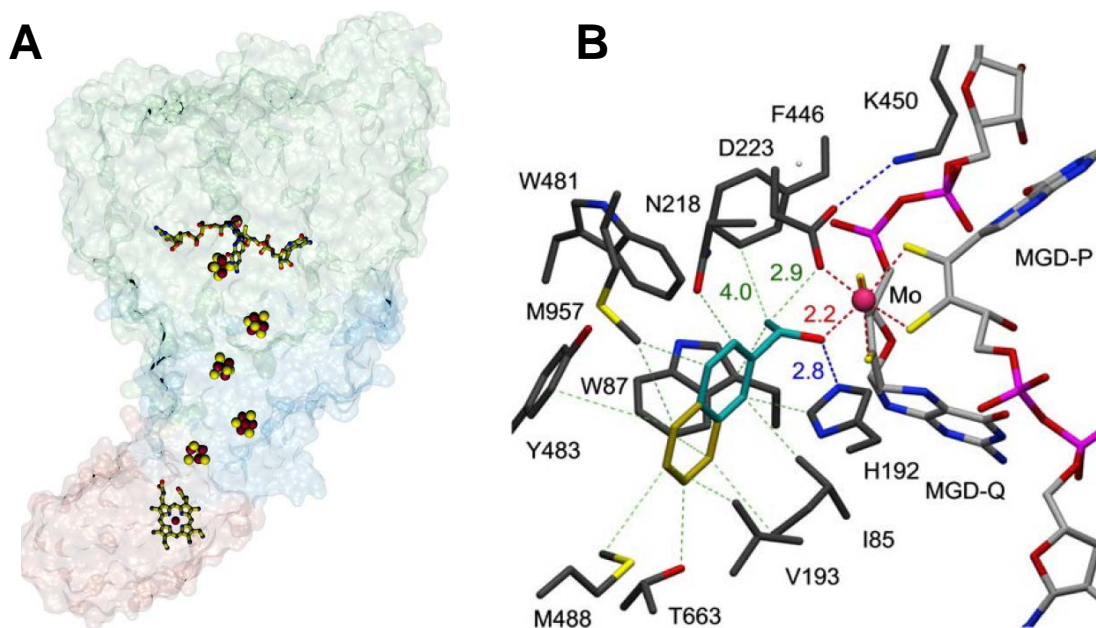


Abb. 6: Struktur der Ethylbenzol Dehydrogenase und ihres aktiven Zentrums. A: Quartärstruktur der Ethylbenzol Dehydrogenase. Von oben nach unten: α-Untereinheit (hellgrün) mit Molybdäncofaktor und Eisen-Schwefel Cluster; β-Untereinheit (hellblau) mit Eisen-Schwefel Clustern; γ-Untereinheit (hellrot) mit Häm *b* Cofaktor; adaptiert aus: (Heider, 2008). B: Dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums der Ethylbenzol Dehydrogenase. In das aktive Zentrum hineinmodelliert wurden die Produkte (S)-1-Phenylethanol (cyan) und 1-(2-Naphthyl)ethanol (cyan + gelb). Neben dem *bis*MGD Cofaktor sind einige Aminosäuren des aktiven Zentrums dargestellt; entnommen aus: Kloer et al. (2006).

9. EbDH-ähnliche Enzyme

Die Ethylbenzol Dehydrogenase war bei ihrer Entdeckung vor etwas mehr als 10 Jahren ein neuartiges und einzigartiges Enzym bezüglich der Reaktion die es katalysiert. Erst kürzlich wurde jedoch im Genom des sulfatreduzierenden alkanabbauenden Deltaproteobakteriums *D. oleovorans* ein Gencluster entdeckt, der für ein sehr ähnliches Enzym zur EbDH aus *A. aromaticum* kodiert. Die putativen Genprodukte haben eine hohe Sequenzidentität zu den Untereinheiten der Ethylbenzol Dehydrogenase und die Anordnung der Gene ist ähnlich zu der im Operon der Ethylbenzol Dehydrogenase. Da dieses Bakterium Ethylbenzol als Substrat nicht verwerten kann, muss das Enzym eine andere Funktion besitzen. Ein weiteres EbDH-ähnliches Enzym wurde auch in dem denitrifizierenden *Sterolibacterium denitrificans* entdeckt, wo es die sauerstoffunabhängige Hydroxylierung des tertiären C25 Atoms von Cholesterin katalysiert (Steroid C25 Dehydrogenase; Dermer und Fuchs, 2012). Die Untereinheiten dieses Enzyms haben ebenfalls eine hohe Sequenzidentität zu den Untereinheiten der EbDH. Im Genom von *S. denitrificans* finden sich darüber hinaus Gene für sieben weitere Isoenzyme der Steroid C25 Dehydrogenase sowie für ein EbDH-ähnliches Enzym.

Schwerpunkte der Untersuchungen

Der Schwerpunkt dieser Dissertation waren Untersuchungen zur Aufklärung des katalytischen Mechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase, dem initialen Enzym des anaeroben Ethylbenzolabbaus in *A. aromaticum*. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die sauerstoffunabhängige Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol höchstwahrscheinlich über zwei konsekutive Radikal- und Carbokation-Intermediate abläuft. Darüber hinaus wurden Informationen über das Anwendungspotential des Enzyms für die Biosynthese von chiralen Alkoholen gewonnen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden bisher in zwei Fachartikeln veröffentlicht. Der restliche Teil der Ergebnisse lieferte wichtige Erkenntnisse über das kinetische Modell des Reaktionsmechanismus des Enzyms und die Stereospezifität der C-H Spaltung als initialem Schritt der Hydroxylierungsreaktion. Ferner wurden Wachstumsversuche von *D. oleovorans* auf Alkanen als Substraten durchgeführt und die jeweils induzierten Proteine analysiert. Dadurch konnten erste Ergebnisse erzielt werden, die zum Vorschlag eines neuartigen anaeroben Alkanabbauweges führten.

Materialien und Methoden

1. Geräte

Die verwendeten Geräte wurden nach Herstellerangaben betrieben bzw. genutzt.

Zentrifugen

Centrifuge 5403	Eppendorf
Biofuge fresco	Heraeus
SORVALL RC 5B plus	Thermo Electron
Optima L90-K Ultrazentrifuge	Beckman coulter
Durchlaufzentrifuge Typ Z41	Carl Padberg Zentrifugenbau

Spektralphotometer

Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific
µQuant ELISA Reader	Bio-Tek Instruments, Inc.
ND-1000	Nanodrop

Elektrophorese

Geldokumentationssystem	INTAS
Stromquellen Enduro	Labnet International, Inc.
Kammern und Kämme für Agarosegele	Werkstatt
Kammern und Kämme SDS-PAGE	BIO-RAD
UV-Schirm	Vilber Lourmat

sonstige Geräte

100 l Fermenter Typ 883525/0	B.Braun Melsungen
FPLC ÄKTA™ purifier	GE Healthcare
French Pressure Cell Press	American Instruments Company
Autoklav Hiclave HV-25	HMC
Waage MC-1	Sartorius
Inkubator Thermomixer comfort	Eppendorf
PCR-Cycler Tpersonal	Biometra
Kugelmühle Mikro-Dismembrator S	B.Braun Biotech International
Rotationsverdampfer	Büchi

2. Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität p.A. (*pro Analysi*) von folgenden Herstellern bezogen: Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Alfa-Aesar, TCI, AppliChem, Invitrogen, Fluka, Roche, BIO-RAD. Gase wurden von den Firmen Air Liquide und Praxair bezogen.

3. Kulturmedien, Lösungen und Puffer

Kulturmedien, Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, nach (Sambrook, 2001) hergestellt. Alle Kulturmedien, Lösungen und Puffer wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt. Weitere Details zu Kulturmedien, Lösungen und Puffern sind den einzelnen Unterkapiteln zur Kultivierung der jeweiligen Organismen zu entnehmen.

4. Sonstige Materialien

DEAE-Sepharose FastFlow	GE Healthcare
MacroPrep Ceramic Hydroxyapatit Typ II	BIO-RAD
Filtropur S 0,2/0,45 µm Sterilfilter	Sarstedt

5. Biochemikalien und Molekularbiologie

Phusion High Fidelity PCR Kit	Finnzymes
KAPA High Fidelity PCR Kit	KAPA Biosystems
T4 DNA Ligation Kit	Thermo Scientific
Omni-Pure-Kit	Omni Life Science
Gene-Jet Kit	Thermo Scientific
Gel Extraction Kit	PeqLab Biotechnologie
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
bac-dna-Kit	Omni Life Science

6. Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden je nach Anforderung in unterschiedlichen Konzentrationen zusammen mit geeigneten Puffern der jeweiligen Herstellerfirma eingesetzt.

Lysozym	AppliChem
Desoxyribonuklease (DNase)	Thermo Scientific
Phusion high fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
KAPA High Fidelity DNA Polymerase	KAPA Biosystems
Ribonuklease A (RNase A)	Sigma-Aldrich
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific
Restriktionsendonukleasen	Thermo Scientific

7. Vektoren

Vektoren wurden zum kurzfristigen Verbrauch bei 4°C und zur langfristigen Aufbewahrung bei -20°C gelagert. Nachfolgend sind alle Vektoren mit ihren Spezifikationen und Bezugsquellen aufgelistet (Tab. 1).

Tab. 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren

Name	Genotyp	Referenz
pEntry-IBA20	KanR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH
pNFUSE-IBA-SD1	AmpR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH
pCFUSE	AmpR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH
pASG-IBA3 (C-terminales StrepTagII)	AmpR, TetR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH

8. Längen- und Molekulargewichtstandards

Folgende Längen- bzw. Molekulargewichtstandards wurden verwendet:

GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Thermo Scientific

Page Ruler Prestained Protein Ladder/Ladder plus

Thermo Scientific

9. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers bezogen und in einer Konzentration von 100 pmol/μl eingesetzt. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind fettgedruckt. fw/5' = *forward*; rv/3' = *reverse*; Oligonukleotide sind in 5'-3' Richtung dargestellt.

Amplifikation EbDH-ähnliches Enzym:

EbDH_alpha_s_Do (**Lgul**)

AAGCTCTTCAATGAAGGAAGTAAAAATCTCCCGAAGGACC

EbDH_alpha_as_Do (**Lgul**)

AAGCTCTTCACCCCGCCTTTTCCACGTTTACGGAGATGC

EbDH_gamma_s_Do (**Lgul**)

AAGCTCTTCAATGGAAAAAGTAATATGCAAAAAGATTGCAACCGC

EbDH_delta_as_Do (**Lgul**)

AAGCTCTTCACCCCGCGGGTTTGTGCTTCGTTCAAGTAAGC

Stille Mutation α Untereinheit EbDH-ähnliches Enzym (AGC -> AGT)

Lgul_mut_fw CGAGT**GGAAGAGT**TACGAC (**Lgul**)

Lgul_mut_rev GGAAACATGAAAGGTTCCC

Sequenzierung:

pEntry:

pEntry fwd GGGTTATTGTCTCATGAGCG

pEntry rev CCCCTGATTCTGTGGATAACCG

pEntry revII TTACGGTTCCTGGCCTTTTG

EbDH-like intern:

EbDH-like_a_intern_fw CCCGGTCTACACCCGGATTCCC

EbDH-like_a_intern_rev GCCAGCATCAGGCAGATCTCCC

EbDH-like_gdb_intern_fw CGCCAGATCGGCATGGTGATGG

EbDH-like_gdb_intern_rev CCATCAGTTCCGAGCGGC

pASG:

pASG_fw GAGTTATTTTACCACTCCCT

pASG_rev CGCAGTAGCGGTAAACG

pASG_stromaufwärts_LacZ GGACATTTGTATATCTCC

pASG_stromabwärts_LacZ CCCTCACTAAAGGG

10. Organismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tab. 2).

Tab. 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Organismen

Stamm	Genotyp	Antibiotika-resistenz	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, ϕ80d/lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺), phoA, supE44, λ-	Nalidixinsäure	Woodcock et al., 1989
<i>Escherichia coli</i> JM109	endA1, glnV44, thi-1, relA1, gyrA96, recA1, mcrB ⁺ , Δ(lac-proAB), e14- [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15], hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Nalidixinsäure	Yanisch-Perron et al., 1985
<i>Escherichia coli</i> FM420	k.A.	k.A.	Heider et al., 1991
<i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN1	Wildtyp; DSM-Nr. 9506	keine	Rabus und Widdel, 1995
<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3	Wildtyp; DSM-Nr. 6200	keine	Aeckersberg et al., 1991

Methoden

1. Software- und Internetanwendungen

Vektorkarten wurden mit dem Programm pDraw (AcaClone Software) erstellt. Sequenzen wurden mit dem Programm DNAMAN (Lynnon BioSoft) oder einer im Internet frei zugänglichen Software (www.expasy.com; Multalin) auf Korrektheit überprüft. Für die Literaturrecherche und Sequenzanalysen wurden im Internet frei zugängliche Datenbanken (NCBI, Pubmed, BLAST etc.) genutzt. Alignments von Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm ClustalW erstellt. Die Aufzeichnung von Enzymaktivitäten erfolgte mit der Software VisionLite (Thermo Scientific) und die anschließende Analyse der enzymkinetischen Daten mit den Programmen Prism (GraphPad Software) und LEONORA (Cornish-Bowden, 1995). Zur Darstellung von dreidimensionalen Strukturmodellen der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde der Discovery Studio Visualizer 3.5 (Accelrys) verwendet.

2. Mikrobiologische Methoden

2.1 Herstellung von Medien für die anaerobe Kultivierung

Für die Herstellung der Wachstumsmedien zur Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen wurden die einzelnen Bestandteile der Medien zuvor anaerobisiert. Dazu wurden die Grundmedien und die notwendigen Supplemente in 100 ml bis 2 l Glasflaschen mit Gummistopfen (Schott oder Müller-Krempel) auf mindestens 80 °C erhitzt und dann für mindestens 1 h unter Ansetzen eines Vakuums (1 Bar) entgast. Nach dem Abkühlen wurden die Grundmedien mit einem Gasgemisch aus N₂ und CO₂ (90:10) und die Supplemente mit N₂ begast (1 Bar Enddruck). Anschließend wurden die nun anaerobisierten Flüssigkeiten autoklaviert (120 °C, 1 h, 1 Atü). Nach dem Autoklavieren konnten die Grundmedien mit den Supplementen (Vitaminlösungen, Spurenelementlösungen, Reduktionsmittel u.a.) mit sterilen Spritzen komplementiert werden. Der pH Wert der Medien wurde durch die Zugabe von 6 M HCl oder 1 M H₂SO₄ ebenfalls durch die Zugabe mit Spritzen eingestellt. Hitzelabile Lösungen (z.B. Vitamine) wurden zunächst in eine zuvor evakuierte und mit N₂ begaste Flasche sterilfiltriert (Sterilfilter 0,2 µm; Schleicher & Schuell). Das komplementierte Medium konnte 2-3 Tage nach der Komplementation inokuliert werden. Die Lagerung des nicht-inokulierten Mediums konnte bei 4 °C für 2-3 Wochen erfolgen.

2.2 Kultivierung von *Aromatoleum aromaticum*

A. aromaticum wurde in dieser Arbeit anaerob und unter denitrifizierende Bedingungen mit Ethylbenzol als einziger Kohlenstoff- und Elektronenquelle angezogen. Die Kultivierung erfolgte in Mineralsalzmedium in 2 l Flaschen (Schott) schüttelnd (80 rpm) oder in einem 100 l Fermenter (B.Braun Melsungen) bei jeweils 30 °C. Ethylbenzol wurde in einer Endkonzentration von 3,5 mM und Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor in einer Endkonzentration von 10 mM eingesetzt (als Natriumsalz; NaNO_3). Zusätzlich wurde Paraffinöl als Trägerphase für Ethylbenzol (2 % (v/v) im Medium) zugegeben. Der Nitratverbrauch von aktiv wachsenden Kulturen wurden mit Nitratteststäbchen Quantofix Nitrat (Macherey und Nagel) gemessen und bei Bedarf 3,5 mM Ethylbenzol und 10 mM Nitrat nachgegeben. Zur Kultivierung im 100 l Fermenter wurden vorher 5x 2 l Vorkulturen angezogen und diese als Inokulum verwendet (10 % (v/v)). Das Wachstum der Zellen wurde über Messung der optischen Dichte ($\text{OD}_{578\text{nm}}$) verfolgt. Da das gelöste Paraffinöl zu einer erhöhten optischen Dichte führt, wurden die Proben für die OD-Bestimmung zuerst abzentrifugiert (10 min bei 4 °C und 5000 rpm). Das Zellpellet wurde anschließend mit der gleichen Menge an Grundpuffer resuspendiert und die OD gemessen. *A. aromaticum* wurde ca. 5-6 Tage bis zu einer $\text{OD}_{578} \sim 5$ angezogen und die Zellen mit einer Durchlaufzentrifuge (Carl Padberg Zentrifugenbau) geerntet. Üblicherweise wurden ca. 300 g an Feuchtzellen pro 100 l Kultur erhalten. Die Feuchtzellen wurden zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Mineralsalzmedium (pH=7,5)

KH_2PO_4	0,5 g/l
NH_4Cl	0,3 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,1 g/l
<u>NaNO_3</u>	<u>0,85 g/l</u>

- + Spurenelementlösung II (1:1000)
- + Vitaminlösung 7 (1:1000)
- + Selenit-Wolframatlösung (1:1000)
- + 1 M NaHCO_3 (1:25)
- + 6 M HCl (1:2500)
- + Ethylbenzol (350 µl/l)

Spurenelement Lösung II (SL II) (1000-fach)

Na ₂ -EDTA	5200 mg/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2100 mg/l
H ₃ BO ₃	30 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg/l
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	29 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	144 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg/l

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt.

Vitaminlösung 7 (VL-7) (1000-fach)

Cyanocobalamin	100 mg/l
Pyridoxamindihydrochlorid	300 mg/l
Thiamindichlorid	20 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat	100 mg/l
4-Aminobenzoessäure	80 mg/l
D(+)-Biotin	20 mg/l
Nicotinsäure	200 mg/l

Selenit-Wolframat-Lösung (Se-Wo) (1000-fach)

NaOH	400 mg/l
Na ₂ SeO ₃	4 mg/l
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	8 mg/l

2.3 Kultivierung von *Desulfococcus oleovorans*

D. oleovorans wurde in dieser Arbeit anaerob unter sulfatreduzierenden Bedingungen in Mineralsalzmedium kultiviert. Als einzige Kohlenstoff- und Elektronenquellen wurden Palmitat, Hexadecan, 1-Hexadecanol und 2-Hexadecanol zugegeben. Die Kultivierung erfolgte in 500 ml bis 2 l Flaschen mit Gummistopfen (Schott oder Müller-Krempel) über einen Zeitraum von 2-4 Monaten. Das Wachstum der Kulturen wurden über die Sulfidbildung innerhalb der Kulturen bestimmt (kolorimetrische Sulfidbestimmung; Cline, 1969). Die Ernte der Kulturen erfolgte nachdem die Kulturen die stationäre Phase erreicht hatten unter aeroben Bedingungen (Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min mit SORVALL RC 5B plus,

SLA-1500 Rotor). Üblicherweise wurden je 1 l Kultur 200-300 mg Feuchtzellen erhalten die bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurden.

Mineralsalzmedium (pH=7,2)

KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
NaCl	20,0 g/l
NH ₄ Cl	0,25 g/l
Na ₂ SO ₄	4,0 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	3,0 g/l
CaCl ₂ x H ₂ O	0,15 g/l
KCl	0,5 g/l
<u>Resazurin</u>	<u>1 mg/l</u>

- + Spurenelementlösung 10 (1:1000)
- + Vitaminlösung 7 (1:1000)
- + Selenit-Wolframatlösung (1:1000)
- + 1 M NaHCO₃ (1:33)
- + 200 mM Na₂S x 9 H₂O (1:133)
- + 5 % Na₂S₂O₄ (1:1666; frisch im Anaerobenzelt angesetzt)
- + 100 mM Palmitat (1:100)
- oder
- + 99 % Kohlenwasserstoffsubstrat (1:3333)

100 mM Palmitat

100 mM Palmitinsäure unter Kühlung mit 100 mM NaOH versetzen. Danach auffüllen mit Wasser auf gewünschtes Volumen.

Spurenelementlösung 10 (SL-10) (1000-fach)

HCl (25 %; 7,7 M)	10,00 ml/l
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,50 g/l
ZnCl ₂	70,00 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100,00 mg/l
H ₃ BO ₃	6,00 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190,00 mg/l
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2,00 mg/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24,00 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36,00 mg/l

FeCl₂ in HCl lösen, die restlichen Salze hinzufügen und lösen.

2.4 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde nach den Angaben der Hersteller in sterilem LB-Medium (Sambrook, 2001) schüttelnd oder auf LB-Platten bei 37 °C kultiviert. Für die Überproduktion des EbDH-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans* wurde auch M9ZB-Medium verwendet (siehe Kapitel 2.7). Zur Selektion wurde den Medien in Abhängigkeit von vorhandenen gen- oder plasmidkodierten Resistenzen 100 µg/ml Ampicillin, und 50 µg/ml Kanamycin zugegeben.

Luria Bertani (LB) Medium (pH=7,0)

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
(Agar-Agar)	(14 g/l für Platten)

2.5 Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen

Die Herstellung von kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (1983). Dafür wurde zunächst eine Bakterienkultur in 5 ml LB-Medium durch eine Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser Kultur wurden 100 µl verwendet, um eine 100 ml Kultur anzupflanzen. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 0,2 - 0,4 wurde diese Kultur 10 min. auf Eis inkubiert und zentrifugiert (SORVALL RC 5B plus, SLA-1500 Rotor, 10 min/5000 rpm/2 °C). Alle ab hier verwendeten Materialien waren auf 4 °C vorgekühlt (CaCl₂-Lösung, Rotor, Zentrifuge, Reaktionsgefäße). Das Pellet wurde anschließend in 5 ml einer eiskalten 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert und die Zellen erneut wie zuvor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet ein zweites Mal in 5 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein letztes Mal wie zuvor zentrifugiert und die Zellen nochmals in 0,5 - 1 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Zellen wurden dann bei 4 °C gelagert und bis zu 2 Tage später für Transformationen eingesetzt. Für die Langzeitlagerung wurde die Zellsuspension in 0,5 ml 50 mM CaCl₂ + 0,2 ml 10 % Glycerin (steril) aufgenommen, in vorgekühlte Reaktionsgefäße à 50 - 100 µl abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.6 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation von *E. coli* Zellen erfolgte mit chemisch kompetenten Zellen (Kapitel 2.5) durch Hitzeschock. Dazu wurden die CaCl₂-kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 5 µl des StarGate® Reaktionsansatzes (Kapitel 3.6) oder 1 µl Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Ansätze für 90 s in einem Wasserbad bei 42°C

inkubiert (Hitzeschock). Danach wurden sie erneut kurz auf Eis gestellt und dann in 300 µl LB-Medium für ca. 60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit geeignetem Selektionsantibiotikum (Kapitel 2.4) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am Tag darauf wurden einige der gewachsenen Kolonien in 5 ml LB-Medium mit geeigneten Selektionsantibiotika überimpft und erneut über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

2.7 Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Produktion von rekombinanten Proteinen wurden in dieser Arbeit die *E. coli*-Stämme DH5α, JM109 und FM420 verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem gewünschten Plasmid transformiert (Kapitel 2.6) und auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika bei 37 °C inkubiert. Positive Klone wurden in eine 5 oder 10 ml LB-Vorkultur überimpft und diese über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine 150 oder 300 ml Kultur in LB-Medium oder M9ZB-Medium mit einer OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und diese bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 anaerob inkubiert (ca. 2 - 3 h). Als Elektronenakzeptor diente Na-Fumarat (50 mM). Vor der Induktion der Kulturen wurde 100 µM NaNO₃ (100 mM; 1:1000) zugegeben und je 1 ml Probe für eine SDS-PAGE entnommen (Probe t=0 h). Die Induktion erfolgte mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin (AHT). Die Zellen wurden nach der Induktion für 8 h bei RT schüttelnd inkubiert (80 rpm) und im Abstand von 1 oder 2 h je 1 ml Probe entnommen (t=1, 2, 3 etc.). Nach dem Ende der Überproduktion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min geerntet (SORVALL RC 5B plus, SLA-1500 Rotor) und die Zellpellets zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die entnommenen Proben wurden mit einem definierten Volumen an 5x SDS-Probenpuffer versetzt, so dass die Proteinkonzentration der Probe 2 µg/µl entsprach.

M9ZB-Medium (pH=7,5)

Bacto-Trypton	10 g/l
Na ₂ PO ₄	15 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NaCl	0,5 g/l
<u>NH₄Cl</u>	<u>1 g/l</u>
+ 20 % Glucose (1:100)	
+ 1 M MgSO ₄ (1:500)	
+ SL10 (1:100)	
+ VL7 (1:100)	
+ Se-Wo (1:100)	

- + 100 mM Na₂MoO₄ (1:100)
- + 500 mM Fe(III)Citrat (1:100)
- + 250 mM L-Cystein (1:100)

3. Molekularbiologische Methoden

3.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Aromatoleum aromaticum*

Die Isolation von genomischer DNA aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 erfolgte mit dem bac-dna-OLS Kit von Omni Life Science nach dem Protokoll des Herstellers.

3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Dafür wurden zunächst die Zellen aus einer Bakterienkultur in der Wachstumsphase in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 13000 rpm 30 s abzentrifugiert (Biofuge fresco) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 150 µl Puffer P1 resuspendiert und danach 200 µl Puffer P2 hinzugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde ca. 5 min inkubiert und dann 200 µl Puffer P3 sowie 25 µl Chloroform hinzugegeben und kräftig geschüttelt. Das Gemisch wurde 5 min auf Eis inkubiert und nochmals kräftig geschüttelt. Im Anschluss an diesen Schritt wurde das Gemisch für 5 min bei 4 °C bei 13000 rpm zentrifugiert (Biofuge fresco) und der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Überstand wurden 350 µl Isopropanol hinzugegeben und erneut bei 4 °C und 13000 rpm für 20 min zentrifugiert (Biofuge fresco). Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen (Hinzugabe von 350 µl Ethanol und kurze Zentrifugation bei 13000 rpm, Biofuge fresco). Der Überstand wurde erneut abgenommen, das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

Zur Isolation von Plasmid-DNA, die für eine Sequenzierung verwendet werden sollte, wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwendet.

P1 (pH=8,0)

Tris/HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

P2

NaOH	200 mM
SDS	1 %

P3 (pH=5,0)

Kaliumacetat	2,8 mM
--------------	--------

3.3 Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA erfolgte nach Saiki et al. (1988). Als DNA Matrize diente genomische DNA aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 oder Plasmid DNA. Reaktionen wurden gemäß der Protokolle der Hersteller Finnzymes und KAPA Biosystems angesetzt und wurden in Bezug auf das eingesetzte DNA-Volumen je nach Anforderung angepasst.

Standard PCR Programm:

(1) Initiale Denaturierung der DNA	98°C	5 min	} x 29
(2) Denaturierung in jedem Zyklus	98°C	20 s	
(3) Hybridisierung/Annealing der Primer	T_A^{*1}	20 s	
(4) Elongation der Polymerase	72°C	30 - 60 s ^{*2}	
(5) Finale Elongation	72°C	5 min	

*1 Die „Annealing“ Temperaturen der verwendeten Primer wurden wie folgt berechnet:

$$T_A = T_M - 3$$

$$T_M = 69,3^\circ\text{C} + 41,0^\circ\text{C} - \text{G+C/Primerlänge in kb} - 650/\text{Primerlänge in kb}$$

(T_M ist die Temperatur bei der 50 % der Oligonukleotide aufgeschmolzen sind)

*2 abhängig von der Sequenzlänge

3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA Lösungen wurden mit dem Spektralphotometer ND-1000 von NanoDrop bestimmt. Dazu wurde 1 µl einer DNA Lösung auf den Sensor des Photometers gegeben und die Absorption bei 230, 260 und 280 nm unter Verwendung der Einstellungen „Nucleic Acids“ und *Sample Type* „DNA-50“ gemessen. Die Software des Spektrometers errechnete anhand der Absorptionswerte die Nukleinsäurekonzentration.

3.6 Modifikation von DNA nach dem StarGate® System (IBA Life Science)

Entry-Cloning

Bei diesem System findet die Restriktion und Ligation von PCR Produkt und Vektor in einem Reaktionsansatz statt. Dabei wurde das gewünschte Gen zunächst in einen Donorvektor (pEntry-IBA20; Abb. 7) und aus diesem anschließend in einen gewünschten Expressionsvektor kloniert. Die Restriktion erfolgte über Restriktionsendonukleasen des Typs IIS.

Reaktionsansatz Klonierung PCR Produkt in Donorvektor:

PCR-Produkt	100 ng
pEntry	25 ng
10 x Tango Puffer	5 µl
ATP (10 mM)	2,5 µl
Dithiothreitol (100 mM)	5 µl
<i>Lgul</i> (5 U/µl)	0,5 µl
T4-Ligase	1 µl
dH ₂ O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und ein Aliquot von 5 µl in *E. coli* DH5α transformiert (Kapitel 2.6). Die Selektion auf positive Klone erfolgte über Kanamycin (50 µg/ml) und X-Gal (20 µg/ml; blau-weiß-Test). Von positiven Klonen wurde eine Restriktionsanalyse mit *Esp3I* durchgeführt sowie eine Sequenzierung wenn die Klone nach Restriktion ein Insert der richtigen Größe enthielten.

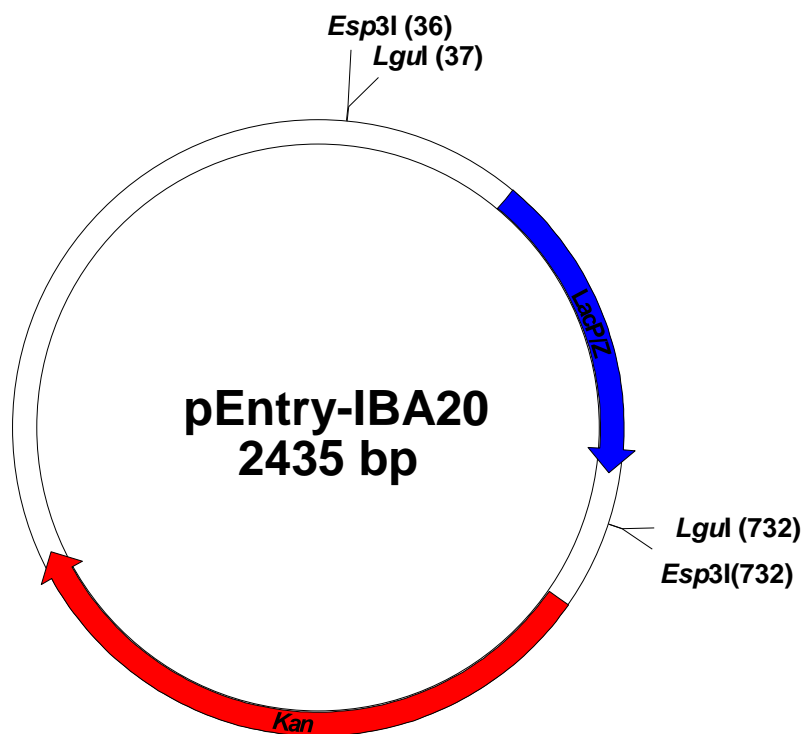


Abb. 7: Vektorkarte des Donorvektors pEntry-IBA20. LacP: Lac Promotor. LacZ: Gen der β-Galactosidase. Kan: Kanamycinresistenzgen.

Klonierung des gewünschten Inserts in pASG-IBA Expressionsvektoren:

pEntry Plasmide die das gewünschte Insert enthielten, wurden in folgendem Reaktionsansatz zur Klonierung des Inserts in verschiedene pASG-IBA Expressionsvektoren eingesetzt:

pEntry-IBA20	100 ng
Expressionsvektor	25 ng
10x Tango Puffer	5 µl
ATP (10 mM)	2,5 µl
Dithiothreitol (100 mM)	5 µl
<i>Esp3I</i> (10 U/µl)	0,5 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und ein Aliquot von 5 µl in *E. coli* DH5α transformiert (Kapitel 2.6). Die Selektion erfolgte über Ampicillin (100 µg/ml) und X-Gal (25µg/ml; blau-weiß-Test. Von positiven Klonen wurde eine Restriktionsanalyse mit *XbaI* und *HindIII* durchgeführt.

Fusion Cloning

Dieses System ist eine Modifikation des *Entry-Cloning* mit dem mehrere Gene in beliebiger Reihenfolge miteinander fusioniert werden können. Dazu werden Gene die bereits in pEntry Vektoren kloniert wurden in einen sogenannten pNFUSE oder pCFUSE Vektor kloniert, je nachdem ob sie später am 5'-Ende des Fusionsgens (pNFUSE) oder am 3'-Ende (pCFUSE) liegen sollen (siehe Abb. 8). Befinden sich ein oder mehrere Gene in den pCFUSE oder pNFUSE Vektoren, können sie in einer weiteren Reaktion gemeinsam in einen pEntry Vektor kloniert werden. Aus diesem pEntry Vektor kann dann der Transfer in Expressionsvektoren wie beim *Entry Cloning* erfolgen. Der Transfer von Genen aus pEntry Vektoren in die pFUSE Vektoren kann beliebig oft erfolgen und so ganze künstliche Operone erstellt werden (siehe Abb. 8) Die einzelnen Reaktionsansätze entsprechen den Ansätzen die bereits für das *Entry Cloning* beschrieben wurden. Die Reaktion der Klonierung von Genen aus pEntry in pFUSE Vektoren entspricht dabei der Reaktion der Klonierung von Genen aus pEntry in die Expressionsvektoren (pASG). Die Reaktion der Klonierung von Genen aus pFUSE Vektoren in pEntry entspricht der Reaktion der Klonierung von PCR Produkten in pEntry. Von beiden pFUSE Vektoren müssen je 100 µg für diese Reaktion verwendet werden.

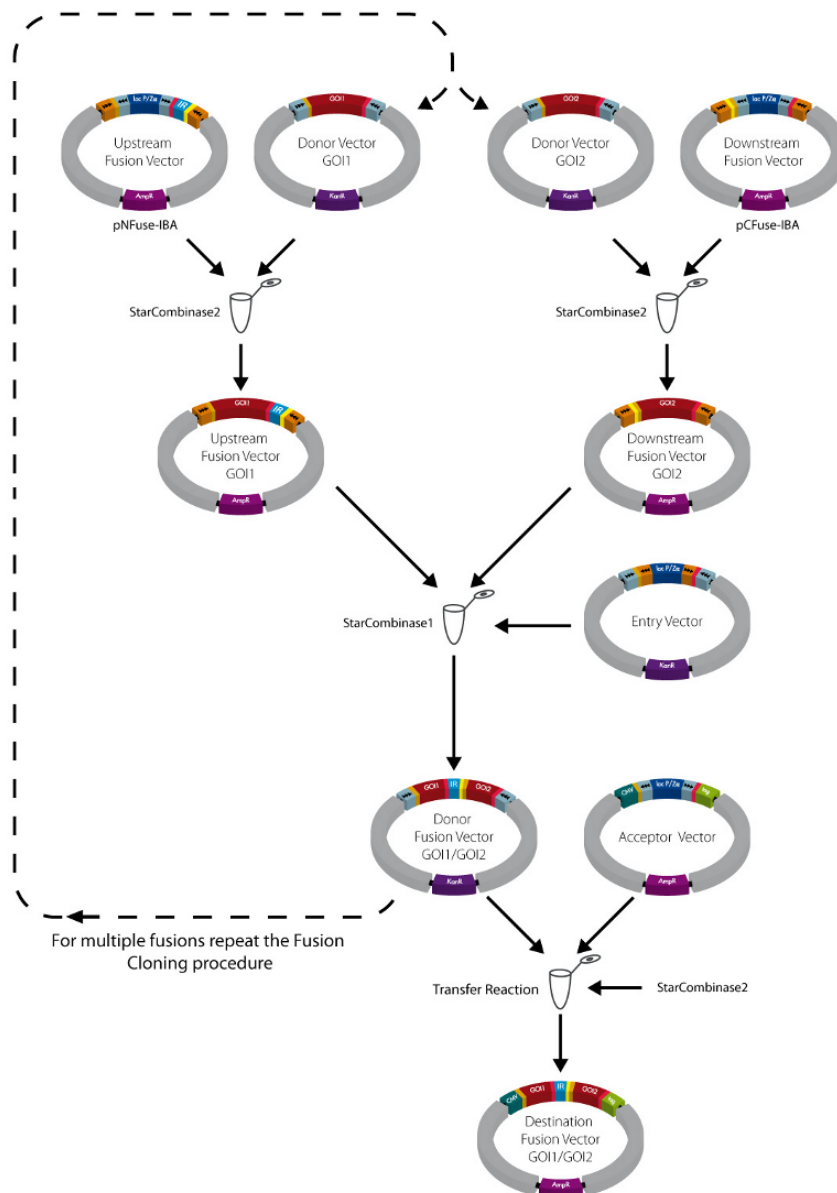


Abb. 8: Flussdiagram Fusion Cloning. Entnommen von IBA LifeScience GmbH

3.7 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese erfolgte nach Sambrook (2001) in Gelen mit 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer. Je Geltasche wurden 1 - 50 µl DNA aufgetragen, die mit einem geeigneten Volumen 6x Probenpuffer (Thermo Scientific) gemischt worden war. Die DNA-Fragmente wurden bei Spannungen von 80 bis 120 Volt in ca. 30 - 60 min aufgetrennt. Als DNA Längenstandard wurde der Marker GeneRuler DNA Ladder Mix von Thermo Scientific verwendet (Konzentration 0,5 µg/µl). Dieser wurde nach Herstellerangaben gelagert und verwendet. Die Agarosegele wurden zur Anfärbung der DNA für ca. 20 min. in einem Ethidiumbromid-Färbegrad (1 µg/ml) inkubiert. Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Gel Extraction Kit von Peqlab.

TAE-Puffer (10x):

Tris	242 g
Essigsäure 100 % (v/v)	57 ml
EDTA	50 mM

3.8 DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierungen zur Verifizierung der korrekten Sequenz von klonierten PCR Produkten wurden von der Firma SeqLab durchgeführt.

4. Biochemische Methoden

4.1 Herstellung von Zellextrakt aus *A. aromaticum*

Für die chromatographische Reinigung der Ethylbenzol Dehydrogenase (Kapitel 4.3) wurde Zellextrakt von auf Ethylbenzol gewachsenen *A. aromaticum* Zellen hergestellt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einer French Pressure Cell Press (American Instruments Company). Dazu wurden 10 g Feuchtzellen in 50 ml DEAE Grundpuffer (siehe Kapitel 4.3) + DNase I (0,05 mg/ml) und Lysozym (0,05 mg/ml) resuspendiert, in eine French Pressure Zelle gefüllt und durch Ansetzen und plötzliches Ablassen eines hohen Druckes (137 MPa) aufgeschlossen. Diese Prozedur wurde 3–4-mal wiederholt. Der Zellextrakt wurde anschließend in einer Ultrazentrifuge bei 35000 rpm für 1 h bei 4°C zentrifugiert (Optima L90-K Ultrazentrifuge, Ti-70 Rotor). Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde anschließend für die Reinigung der Ethylbenzol Dehydrogenase verwendet

4.2 Herstellung von Zellextrakt aus *D. oleovorans*

Für die SDS-PAGE Analyse von Zellextrakt aus *D. oleovorans* wurden die Zellen mit einer Kugelmühle (Mikro-Dismembrator S) aufgeschlossen. Zuvor wurden die Feuchtzellen mit 1 ml Grundpuffer (100 mM Tris/Cl, pH=7,5) gewaschen (resuspendiert und anschließend zentrifugiert) und in 1 ml Grundpuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Silikongefäße gegeben die zuvor in flüssigem Stickstoff auf -80 °C abgekühlt wurden und dann bei 2300 rpm für 2 min. mit der Kugelmühle aufgeschlossen. Der nach dem Vorgang gefrorene Zellextrakt wurde nach dem Auftauen mit DNase I (0,05 mg/ml) versetzt, für 20 min. bei RT inkubiert und konnte anschließend für eine SDS-PAGE Analyse verwendet werden.

4.3 Reinigung der Ethylbenzol Dehydrogenase

Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose

Im ersten Schritt der chromatographischen Reinigung der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde der Überstand der Ultrazentrifugation des Zellextrakts (Kapitel 4.3) auf eine DEAE Sepharose FastFlow Chromatographiesäule aufgetragen (Säulenvolumen 60 ml). Die Säule wurde zuvor mit zwei Säulenvolumen DEAE Grundpuffer äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe (ca. 50 ml) wurde die Säule mit drei Säulenvolumen DEAE Grundpuffer gewaschen (Flussrate 2 ml/min). Die Ethylbenzol Dehydrogenase eluierte bereits während dieses Waschvorgangs und wurde im Fraktionskollektor aufgefangen. Alle Schritte dieser Prozedur wurden aerob und bei 4 °C mit einem Äkta FPLC System durchgeführt.

DEAE Grundpuffer (pH 7,5):

Tris/Cl	10 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Ferriceniumtetrafluoroborat	100 µM

Affinitätschromatographie an Ceramic Hydroxyapatit

Im zweiten Schritt der Reinigung wurde der Durchlauf des ersten Reinigungsschritts für eine weitere chromatographische Reinigung auf eine Ceramic Hydroxyapatit (CHT) Chromatographiesäule aufgetragen (Säulenvolumen 50 ml). Die Säule wurde zuvor mit vier Säulenvolumen CHT Puffer 1 äquilibriert. Nach dem Auftragen des Durchlaufs der DEAE Reinigung (ca. 100 ml) wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen CHT Puffer 1 gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Elution der EbDH über 10 Säulenvolumen mit einem angelegten Kaliumphosphatgradienten von 10–300 mM (0-100 % CHT Puffer 2). Die EbDH eluierte typischerweise bei einer Kaliumphosphatkonzentration von 160-220 mM in einem Volumen von ca. 100 ml. Alle Schritte dieser Prozedur wurden aerob und bei 4 °C mit einem Äkta FPLC System durchgeführt. Die Fraktionen mit EbDH Aktivität wurden nach der Reinigung gepoolt und mit einem VivaSpin Membrankonzentrator (MWCO 50 kDa) in einer Zentrifuge (Centrifuge 5403, Eppendorf) konzentriert (Proteinendkonzentration 2-8 mg/ml). Das Proteinkonzentrat wurde in Eppendorfreagiergefäße (1,5 ml) à 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

CHT Puffer 1 (pH 7,5):

Tris/Acetat	10 mM
Kaliumphosphat	10 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Ferriceniumtetrafluoroborat	100 µM

CHT Puffer 2 (pH 7,5):

Tris/Acetat	10 mM
Kaliumphosphat	300 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Ferriceniumtetrafluoroborat	100 µM

4.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen durch eine SDS Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese erfolgte nach dem diskontinuierlichen System von Laemmli (1970). Es wurden Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 15 % (v/v) verwendet. Proben wurden vor dem Auftrag in 5 x SDS-Auftragspuffer für 5 min. bei 95°C inkubiert und anschließend für 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert (Biofuge fresco). Der Überstand wurde aufgetragen. Zum Auftragen von unlöslichen Proteinen wurde das bei der Zentrifugation des Zellextrakts anfallende Pellet in einem bestimmten Volumen 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen und ein definiertes Volumen d.h. Proteinmenge aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 200 V. Die aufgetragenen Proteinmengen betrugen 20 µg pro Tasche.

Standard-Pipettierschema:

	Trenngel (5 ml)	Sammelgel (2 ml)
Bis-Acrylamid 30 % (v/v)	2,41 ml	480 µl
dH ₂ O	275 µl	1,27 ml
Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	1,95 ml	-
Tris/HCl 0,5 M pH 6,8	-	235 µl
SDS 10 % (w/v)	54,5 µl	20 µl
TEMED 5 % (v/v)	54,4 µl	20 µl
APS 10 % (w/v)	78 µl	40 µl

SDS-Probenpuffer (5x)

0,5 M Tris/HCl pH 6,8	20 % (v/v)
Glycerin	23 % (v/v)
10 % SDS	40 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	Spatelspitze
dH ₂ O	ad 10 ml

SDS-Laufpuffer (1x)

Tris/HCl pH 6,6	25 mM
Glycin	200mM
SDS	0,1%

4.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Dazu wurden Proteinlösungen je nach Anforderung verdünnt, mit der zehnfachen Menge an Bradford-Reagenz versetzt und für 10 min inkubiert. Die Extinktion der Proteinproben wurde danach bei 595 nm in einem ELISA Reader µQuant (Bio-Tek Instruments Inc.) gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand einer BSA-Standardreihe bestimmt.

BSA-Standardreihe: 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml BSA (Doppelbestimmung)

Verdünnungsstufen:

Zellextrakt: 1:1000

Durchlauf/Waschfraktion Proteinreinigung: 1:100, 1:10

Eluat Proteinreinigung: 1:100, 1:10

Bradford Reagenz:

Coomassie Brilliantblau G 0,001 % (w/v)

Ethanol 4,75 % (v/v)

Phosphorsäure 8,5 % (v/v)

4.6 Konzentrierung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinproben wurden diese mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Die Proben wurde dazu mit 1/5 Volumen 24 %iger (v/v) eiskalter TCA versetzt, 30°min bei -20°C inkubiert und für 20 min zentrifugiert (Biofuge Fresco, 13000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 10 µL 0,5 M NaOH aufgenommen und durch kurzes Erhitzen auf 60°C gelöst. Die Probe wurde mit 10 µL 5x SDS-Probenpuffer versehen und konnte für eine SDS-PAGE verwendet werden.

Zur nativen Konzentrierung von Proteinproben wurden diese über VivaSpin Membrankonzentratoren (Sartorius) eingeeengt. Dazu wurden die Proteinproben in die Membrankonzentratoren gegeben und bei 5000 rpm für 10 min zentrifugiert (Centrifuge 5403). Die Zentrifugationsschritte wurden ggf. wiederholt bis die Proteinprobe das gewünschte Volumen hatte. Die verwendeten Membrankonzentratoren hatten eine Ausschlussgrenze von 50°kDa (MWCO).

4.7 Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Zur Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden die Gele für mind. 2 h in Coomassie-Blue-Färbelösung geschwenkt. Danach wurden sie einmal in Coomassie-Entfärbelösung gewaschen und danach mehrmals in 10 %iger Essigsäure. Dadurch wurde Coomassie-Farbstoff, der nicht an Proteine gebunden hat, aus dem Gel gewaschen. Das Gel konnte anschließend fotografiert werden.

Coomassie-Färbelösung:

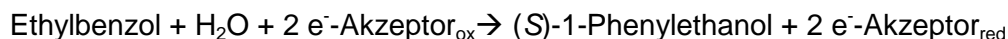
Ethanol	50 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G 250	0,25 % (w/v)

Coomassie-Entfärbelösung:

Ethanol	10 % (v/v)
Essigsäure	7 % (v/v)

4.8 Bestimmung der Enzymaktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der EbDH wurde ein photometrischer Enzymtest verwendet der die Oxidation von Substraten an die Reduktion eines artifiziellen Elektronenakzeptors koppelt (Kniemeyer und Heider, 2001; Szaleniec et al., 2007). Als Elektronenakzeptoren wurden Ferriceniumtetrafluoroborat und Kaliumferricyanid verwendet. Für jeden oxidierten Alkylsubstituenten eines Substratmoleküls werden dabei zwei Elektronenakzeptormoleküle reduziert:



Die Reduktion von Ferriceniumtetrafluoroborat wurde bei 290 nm (ϵ 6.22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 300 nm (ϵ 3,6 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und 310 nm (ϵ 1,7 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), die Reduktion Kaliumferricyanid bei 420 nm (ϵ 1 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und 440 nm (ϵ 0.66 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) in Quarzküvetten (UV-Bereich) oder Glasküvetten verfolgt. Reaktionen (500 μl) wurden wie folgt angesetzt:

Tris/Cl pH=7,5	100 mM
Ferriceniumtetrafluoroborat <i>oder</i>	200 μM
Kaliumferricyanid	2 mM
<u>Ethylbenzol Dehydrogenase</u>	<u>10-200 μg</u>
+ Substrat/Inhibitor	je 2 -500 μM

Jeder Reaktionsansatz wurde zunächst ohne Zugabe des Substrats für 2 min. inkubiert um die Basislinie zu messen. Nach dem Start des Enzymtests durch die Zugabe des Substrates wurde die Anfangsgeschwindigkeit anhand der negativen Extinktionsänderung in den ersten 1-2 min. bestimmt. Für inhibitionskinetische Untersuchungen wurden die Reaktionsansätze 5 min. mit dem Inhibitor inkubiert und gleichzeitig die Basislinie gemessen. Der Start eines Inhibitionstests erfolgte durch Zugabe von Ethylbenzol. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte am Spektralphotometer Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific) mit der Software VisionLite.

Stocklösungen:

1 M Tris/Cl pH=7,5

2 mM Ferriceniumtetrafluoroborat (FcBF_4) in 10 mM HCl

10 mM Kaliumferricyanid ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) in 100 mM Tris/Cl pH=7,5

50x konzentrierte EbDH Substrate/Inhibitoren gelöst in *tert*-Butanol

4.9 Bestimmung von enzymkinetischen Parametern

Zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter von Substraten der EbDH wurden die Enzymaktivitäten von bis zu 10 unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Substrates in Doppelbestimmung gemessen und gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen. Anschließend wurden die experimentellen Daten mit dem Programm Graph-Pad Prism an die Michaelis-Menten Gleichung angepasst. Beim Auftreten von Substratinhibition wurde eine modifizierte Michaelis-Menten Gleichung verwendet (siehe unten). Die Darstellung der Daten und die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter erfolge dann automatisch mit Graph-Pad Prism.

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \left(\frac{K_m}{[S]}\right)} \text{ (Michaelis Menten Gleichung)}$$

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \left(\frac{K_m}{[S]}\right) + \left(\frac{[S]}{K_i}\right)} \text{ (modifizierte Michaelis Menten Gleichung für Substratinhibition)}$$

Zur Bestimmung von inhibitionskinetischen Parametern wurden die Enzymaktivitäten von bis zu 10 unterschiedlichen Ethylbenzolkonzentrationen in Doppelbestimmung in Abhängigkeit von drei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen gemessen. Die erhaltenen inhibitionskinetischen Daten wurden mit dem Programm LEONORA (Cornish-Bowden, 1995) an die folgenden Gleichungen für drei unterschiedliche Inhibitionsmodelle angepasst. Dabei wurde das Model mit der geringsten Standardabweichung als wahrscheinlichstes Model betrachtet.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S]} \text{ (kompetitive Inhibition)}$$

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} \text{ (unkompetitive Inhibition)}$$

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} \text{ (gemischte Inhibition)}$$

Zur Bestimmung des kinetischen Modells des Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase (Ergebniskapitel 4.1) wurden die erhaltenen kinetischen Daten an die modifizierten Michaelis-Menten Gleichungen für das Ping-Pong Bi Bi Modell und das Ternärkomplex Modell mit der Software LEONORA angepasst:

$$v = \frac{V[ab]}{K_m B[a] + K_m A[b] + [ab]} \text{ (Ping-Pong Bi Bi Modell)}$$

$$v = \frac{V[ab]}{K_{AB} + K_m B[a] + K_m A[b] + [ab]} \text{ (Ternärkomplex Modell)}$$

Zur doppelt reziproken Darstellung der Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism theoretische Geraden simuliert. Die Geradengleichungen wurden mit Hilfe der linearen Formen der drei Inhibitions-gleichungen und den inhibitions-kinetischen Parametern aus LEONORA erstellt.

4.10 Enzymatischer Umsatz von EbDH Substraten

Um Produkte zu analysieren die durch den Umsatz von Substraten durch die EbDH erhalten werden, wurden Reaktionen angesetzt und aerob bei 30°C über Nacht inkubiert.

Reaktionsansatz (20 ml) mit Ferriceniumtetrafluoroborat:

Tris/Cl pH=7,5	100 mM
Ferriceniumtetrafluoroborat	400 µM
Substrat	200 µM
EbDH	100-500 µg
→ Inkubation >12 h	

Reaktionsansatz (20 ml) mit Kaliumferricyanid:

Tris/Cl pH=7,5	100 mM
Kaliumferricyanid	5-10 mM
Substrat	1 mM
EbDH	100-500 µg
→ Inkubation >12 h	

Da mit 400 µM bereits die Löslichkeitsgrenze von Ferriceniumtetrafluoroborat erreicht war, konnten die Substrate nur in einer Konzentration von 200 µM eingesetzt werden, um einen vollständigen Umsatz zum Produkt zu gewährleisten (Vergleiche Stöchiometrie der Gesamtreaktion im Methodenkapitel 4.8). Da Kaliumferricyanid eine höhere Löslichkeit als

Ferriceniumtetrafluoroborat besitzt, konnte es in einer höheren Konzentration eingesetzt werden und aus diesem Grund auch die eingesetzte Substratkonzentration erhöht werden.

5. Analytische Methoden

5.1 Chromatographische und Massenspektrometrische Analyse von enzymatischen Produkten

Die Produkte von enzymatischen Umsätzen wurden mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit Massenspektrometrie identifiziert. Zur Analyse wurde die organische Phase der enzymatischen Umsätze extrahiert (siehe unten) und in Kooperation mit Dr. Maciej Szaleniec (Institut für Katalyse und Oberflächenchemie, Polnische Akademie der Wissenschaften, Krakau, Polen) und Dr. Uwe Linne (Abteilung Massenspektrometrie, Fb Chemie, Uni Marburg) analysiert. Die Stereochemie von alkoholischen Produkten wurde zudem mit HPLC an chiraler Phase analysiert (Dr. Maciej Szaleniec).

Methodik/Geräte:

Dr. Maciej Szaleniec:

HPLC-MS: Agilent 1100 HPLC System mit APCI-MS Detektor.

Chirale HPLC: Agilent 1100 HPLC System mit DAD unter Verwendung einer Daicel Chiracel OB-H Säule

GC-MS: Thermo Finnigan Trace DSQ 1000 GC System mit EI-MS Detektor

Dr. Uwe Linne:

GC-MS: Agilent 5973N GC mit FID/MS oder EI/FID-MS (MAT95; Finnigan)

Aufarbeitung von enzymatischen Substratumsätzen:

Nach der über Nacht Inkubation von enzymatischen Substratumsätzen wurde die organische Phase aus diesen Reaktionsmischungen extrahiert. Dies erfolgte je nach Natur der jeweiligen zu erwartenden Produkten entweder über eine Festphasenextraktion mit C18 Säulen (Chromabond, Macherey und Nagel) oder über eine Flüssigphasenextraktion mit Ethylacetat.

Festphasenextraktion mit C18 Säulen

- Waschen (10 ml Methanol)
- Äquilibrieren (1 Säulenvolumen H₂O)
- Proben laden
- Waschen (1 Säulenvolumen H₂O)
- Trocknen
- Eluieren (2 ml Methanol; 2-4 Fraktionen in HPLC Fläschchen)

Flüssigphasenextraktion mit Ethylacetat

- Reaktionsansatz (20 ml) mit 5 ml Ethylacetat in Glasröhrchen extrahieren (kräftiges Schütteln für 1min.)
- Für einige Minuten ruhen lassen bis sich 2 Phasen gebildet haben
- Abnahme der organischen Phase mit Pasteurpipette
- Trocknen der organischen Phase: Durchlauf über Pasteurpipette mit Glaswolle und wasserfreiem MgSO₄
- Elution in HPLC Fläschchen

5.2 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen in dieser Arbeit wurde von Dr. Stefan Baumeister (AG Lingelbach, Fb Biologie, Uni Marburg) mit einem Ultimate nanoRSLC-HPLC System (Dionex) gekoppelt mit einem Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer (Thermo Scientific) durchgeführt.

5.3. NMR Analyse von Syntheseprodukten

Die NMR-Messungen in dieser Arbeit wurden am Fachbereich Chemie der Uni Marburg mit einem AVANCE 300 B (300 Mhz) der Firma Bruker durchgeführt. Dabei wurden ¹H-Spektren bei 300 Mhz und ¹³C-Spektren bei 75,45 Mhz aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm TopSpin 3.0.b.7 von Bruker

6. Chemische Methoden

6.1 Synthese von spezifisch deuteriertem Ethylbenzol

Die Synthese von spezifisch deuteriertem Ethylbenzol erfolgte nach einer modifizierten Methode von Holland et al. (1988). Nach dieser Methode wurden, je nach der optischen

Konfiguration des Ausgangsmaterials 1-Phenylethanol, Ethylbenzolderivate synthetisiert die am C1 Atom des Ethylsubstituenten ein Deuterium in (*S*)- oder (*R*)-Position tragen.

Synthese von (*S*)-[1-²H₁]Ethylbenzol

Als Ausgangsmaterial zur Synthese von (*S*)-[1-²H₁]Ethylbenzol wurde (*R*)-1-Phenylethanol verwendet (Abb. 9). Im ersten Schritt wurde (*R*)-1-Phenylethanol (10 ml; 80 mmol) mit Thionylchlorid (SOCl₂; 25 ml; 345 mmol, vier Äquivalente) für 1 h bei -15°C unter N₂ Begasung in einem Rundkolben umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde im Rotationsverdampfer (Büchi) bei reduziertem Druck und RT konzentriert und die Ausbeute und Reinheit der Probe mit NMR überprüft (Probe DKP 26). Die Ausbeute der Reaktion und ihre Reinheit betrugen 90 %. Direkt im Anschluss an den ersten Schritt wurde das gesamte erhaltene Reaktionsprodukt (*R*)-1-Chloroethylbenzol (10 ml) mit „Superdeuterid“ (Lithiumtriethylbordeuterid; Li(C₂H₅)₃BD) (1 M in THF; 170 ml; 170 mmol; 2 Äquivalente) für 18 h bei RT reduziert (Abb. 9). Das Produkt (*S*)-[1-²H₁]Ethylbenzol wurde dann wie folgt aufgearbeitet: Das Reaktionsgefäßes wurde in einem Eisbad abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser (15 ml) abgestoppt. Anschließend wurde 5 M KOH (56 ml) und H₂O₂ (90 ml) zugegeben. Die Extraktion der organischen Phase erfolgte 4x mit Petrolether (je 75 ml) im Scheidetrichter. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase 2x je 50 ml 6 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde weiter mit Wasser (50 ml) und Brine (gesättigte NaHCO₃ Lösung; 50 ml) gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Rotationsverdampfer bei RT und reduziertem Druck konzentriert. Die Ausbeute und Reinheit wurde erneut mit NMR bestimmt (Probe DKP27). Die Ausbeute betrug ca. 90 %, die Reinheit ca. 30 %.

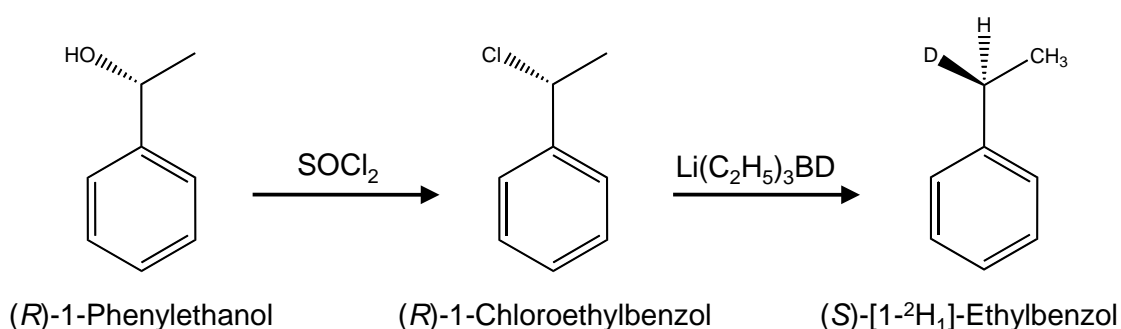


Abb.9: Syntheseweg von (*S*)-[1-²H₁]Ethylbenzol

Synthese von (*R*)-[1-²H₁]Ethylbenzol

Die Synthese von (*R*)-[1-²H₁]Ethylbenzol erfolgte analog zur Synthese von (*S*)-[1-²H₁]Ethylbenzol (Abb. 10). Als Ausgangsmaterial zur Synthese von (*R*)-[1-²H₁]Ethylbenzol wurde (*S*)-1-Phenylethanol verwendet. Im ersten Schritt wurde (*R*)-1-Phenylethanol (10 ml; 80 mmol) mit Thionylchlorid (SOCl₂; 25 ml; 345 mmol, vier Äquivalente) für 1 h bei -15°C unter N₂ Begasung in einem Rundkolben umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde im Rotationsverdampfer (Büchi) bei reduziertem Druck und RT konzentriert und die Ausbeute und Reinheit mit NMR überprüft (Probe DKP38). Die Ausbeute der Reaktion und die Reinheit betrugen ca. 90 %. Direkt im Anschluss an den ersten Schritt wurde das gesamte erhaltene Reaktionsprodukt (10 ml) (*S*)-1-Chloroethylbenzol mit Lithiumaluminiumdeuterid (LiAlD₄; 1 M in Diethylether; 50 ml; 50 mmol; 0,6 Äquivalente) für 41 h bei RT reduziert. Das Produkt (*R*)-[1-²H₁]Ethylbenzol wurde dann wie folgt aufgearbeitet: Das Reaktionsgefäßes wurde in einem Eisbad abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser (15 ml) abgestoppt. Die Extraktion der organischen Phase erfolgte 4x mit Petrolether (je 75 ml) im Scheidetrichter. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase 2x je 50 ml 6 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde weiter mit Wasser (50 ml) und Brine (gesättigte NaHCO₃ Lösung; 50 ml) gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Rotationsverdampfer bei RT und reduziertem Druck konzentriert. Die Ausbeute und Reinheit wurde erneut mit NMR bestimmt (Probe DKP39). Die Ausbeute betrug ca. 90 %, die Reinheit ca. 40 %.

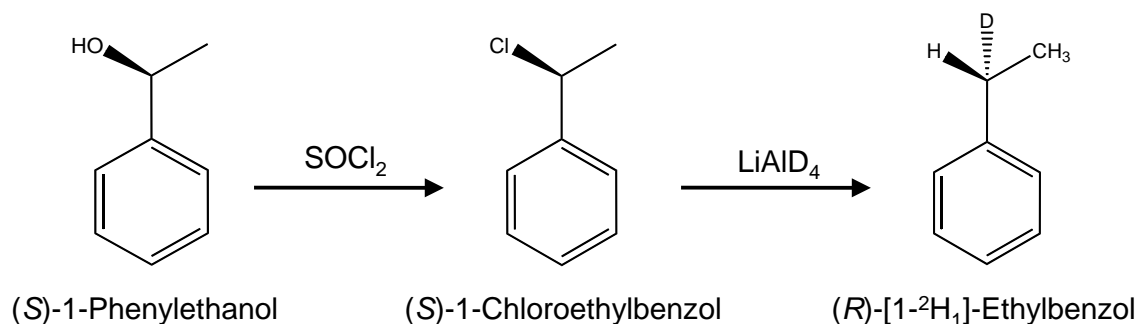


Abb.10: Syntheseweg von (*R*)-[1-²H₁]Ethylbenzol

6.2 Destillation von Syntheseprodukten

Zur Trennung der deuterierten Ethylbenzole von nicht reagiertem Ausgangsmaterial und unerwünschten Nebenprodukten/Kontaminationen wurden die zuvor beschriebenen Reaktionsprodukte destilliert und Fraktioniert. Die Destillation erfolgte in einer Mikrodestille mit verspiegelter Vigreuxsäule, Liebigkühler und Verteilerspinne (Glasgeräteausleihe FB Chemie, Uni Marburg).

Destillation von (S)-[1-²H₁]Ethylbenzol

Der Reaktionsansatz der Synthese von (S)-[1-²H₁]Ethylbenzol enthielt nach NMR Analyse nicht reagiertes Ausgangsprodukt (*R*)-1-Chloroethylbenzol welches durch die Destillation abgetrennt werden sollte. Der Reaktionsansatz wurde dazu in einem Rundkolben unter Rückfluss über mehrere Stunden sukzessiv mittels eines Ölbadts erhitzt bis die einzelnen Fraktionen zu sieden begannen. Vier Fraktionen wurden aufgefangen wobei sich (S)-[1-²H₁]-Ethylbenzol in den Fraktionen Nr. 2 und 3 befand. Fraktion Nr. 1 bestand aus dem Lösemittel THF und Fraktion Nr. 4 aus (*R*)-1-Chloroethylbenzol. Nach NMR Analyse betrug die Reinheit von (S)-[1-²H₁]-Ethylbenzol in Fraktion Nr. 2 ca. 78 %. Diese Fraktion wurde für enzymatische Umsätze und Aktivitätstest verwendet. Es wurde davon ausgegangen dass die restlichen Verunreinigungen (4 % THF, 3 % (*R*)-1-Chloroethylbenzol, 5 % Styrol, 9 % unbekannt Verbindung) keinen erheblichen Einfluss auf die Aktivität bzw. dem Umsatz von (S)-[1-²H₁]-Ethylbenzol haben (NMR Proben DKP 28F1=Fraktion 1 usw. bis F4; siehe auch Anhang Abb. 27)

Destillation von (*R*)-[1-²H₁]Ethylbenzol

Da bei der Destillation von (S)-[1-²H₁]-Ethylbenzol die Trennung von (S)-[1-²H₁]-Ethylbenzol und (*R*)-1-Chloroethylbenzol nur unvollständig gelang, wurde die Destillation von (*R*)-[1-²H₁]-Ethylbenzol unter Ansetzen eines Unterdrucks (120-130 mBar) durchgeführt um die Siedepunkte von (*R*)-[1-²H₁]-Ethylbenzol und (*S*)-1-Chloroethylbenzol voneinander zu trennen. Durch die Vakuumdestillation wurden 2 Fraktionen erhalten wobei Fraktion Nr. 1 (*R*)-[1-²H₁]-Ethylbenzol enthielt und Fraktion Nr. 2 (*S*)-1-Chloroethylbenzol. Nach NMR Analyse betrug die Reinheit von Fraktion Nr. 1 ca. 86 %. 12 % waren unbekannte Verunreinigungen und 2 % Styrol. Fraktion Nr.1 wurde für enzymatische Umsätze und Aktivitätstests verwendet (NMR Proben DKP40-1 und -2; siehe auch Anhang Abb. 28).

NMR Charakterisierung der Syntheseprodukte:

(*RS*)-1-Chloroethylbenzol:

¹H NMR (CDCl₃): δ 1,85 (3H, d, *J* = 6,84 Hz, CH₃) δ 5,10 (1H, q, *J* = 6,82 Hz, CHCl) δ 7,05 – 7,45 (5H, m, *J* = 5,10, C₆H₅) ¹³C NMR (CDCl₃): δ 26,52 (s, CH₃) δ 58,76 (s, CHCl) δ 126,50, 128,24, 128,63, 142,83 (C₆H₅)

(*RS*)-[1-²H₁]-Ethylbenzol:

¹H NMR (CDCl₃): δ 1,23 (3H, dt, *J* = 1,96 Hz CH₃) δ 2,63 (1H, qt, *J* = 2,45 Hz, CHD) δ 7,10 – 7,75 (5H, m, *J* = 3,40 Hz, C₆H₅) ¹³C NMR (CDCl₃): δ 15,52 (s, CH₃) δ 28,61 (dd, CHD *J* = 16,74 Hz) δ 125,58, 127,85, 128,30, 144,22 (C₆H₅)

Ergebnisse

Der Ergebnisteil besteht aus zwei Publikationen in englischer Sprache sowie zusätzlichen Kapiteln in deutscher Sprache mit Daten zur Funktion und zum Mechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase, die bisher noch nicht publiziert sind. Das letzte Kapitel behandelt die Untersuchungen zum anaeroben Alkanabbau in *Desulfococcus oleovorans*:

1. Knack, D. H.; Hagel, C.; Szaleniec, M.; Dudzik, A.; Salwinski, A.; Heider, J. (2012) Substrate and Inhibitor Spectra of Ethylbenzene Dehydrogenase: Perspectives on Application Potential and Catalytic Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* 78(18): 6475-6482.
2. Knack, D. H.; Marshall, J. L.; Harlow, G. P.; Dudzik, A.; Szaleniec, M.; Liu, S.-Y.; Heider, J. (2013) BN/CC Isosteric Compounds as Enzyme Inhibitors: *N*- and *B*-ethyl-1,2-azaborine Inhibit Ethylbenzene Hydroxylation as Non-convertible Substrate Analogues. *Angewandte Chemie International Edition* 52(9): 2599-2601.
3. Untersuchungen zum Anwendungspotential der Ethylbenzol Dehydrogenase
 - 3.1 Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität
 - 3.2 Kaliumferricyanid als alternativer artifizieller Elektronenakzeptor
4. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase
 - 4.1 Bestimmung der Enzymkinetik
 - 4.2 Untersuchung der Enantioselektivität der C-H Spaltung
 - 4.3 Untersuchung einer möglichen Alken-Hydrataseaktivität der EbDH
5. Anaerober Abbau von Alkanen in *Desulfococcus oleovorans*.
 - 5.1 Analyse von Alkan-induzierten Proteinen und Wachstumsversuche auf möglichen Stoffwechselintermediaten
 - 5.2 *In silico* Analyse des Ethylbenzol Dehydrogenase-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans* und Vergleich mit anderen Molybdänenzymen.
 - 5.3 Klonierung der Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans*

Der Inhalt der Publikation

„Knack, D. H.; Hagel, C.; Szaleniec, M.; Dudzik, A.; Salwinski, A.; Heider, J. (2012) Substrate and Inhibitor Spectra of Ethylbenzene Dehydrogenase: Perspectives on Application Potential and Catalytic Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* 78(18): 6475-6482.”

ist aus urheberrechtlichen Gründen in der elektronischen Fassung dieser Dissertation nicht verfügbar.

Unter folgendem Verweis ist jedoch ein Online-Zugriff auf die oben genannte Publikation von der Universitätsbibliothek Marburg aus möglich:

<http://aem.asm.org/content/78/18/6475.long>

Der Inhalt der Publikation

„Knack, D. H.; Marshall, J. L.; Harlow, G. P.; Dudzik, A.; Szaleniec, M.; Liu, S.-Y.; Heider, J. (2013) BN/CC Isosteric Compounds as Enzyme Inhibitors: *N*- and *B*-ethyl-1,2-azaborine Inhibit Ethylbenzene Hydroxylation as Non-convertible Substrate Analogues. *Angewandte Chemie International Edition* 52(9): 2599-2601.”

ist aus urheberrechtlichen Gründen in der elektronischen Fassung dieser Dissertation nicht verfügbar.

Unter folgendem Verweis ist jedoch ein Online-Zugriff auf die oben genannte Publikation von der Universitätsbibliothek Marburg aus möglich:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201208351/abstract>

3. Untersuchungen zum Anwendungspotential der Ethylbenzol Dehydrogenase

3.1 Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität

Die Wasserlöslichkeit der meisten EbDH Substrate ist sehr gering, da es sich um aromatische Kohlenwasserstoffe handelt, die einen hydrophoben Charakter aufweisen. Deshalb können diese Substrate zum Teil nur in geringen Konzentrationen in enzymatischen Tests oder enzymatischen Umsätzen eingesetzt werden. Für den enzymatischen Umsatz von Substraten in großem Maßstab/industriellen Maßstab könnte sich die geringe Wasserlöslichkeit der Substrate als Nachteil erweisen. Eine bessere Löslichkeit könnte man durch den Zusatz organischer Lösungsmittel erreichen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Lösungsmitteln auf die enzymatische Aktivität der EbDH untersucht. Es wurden 13 organische Lösungsmittel ausgewählt, die einen amphiphilen Charakter aufweisen, d.h. einerseits hydrophil genug sind, um sich im Wasser zu lösen, aber andererseits auch hydrophob genug sind, um hydrophobe Stoffe in eine wässrige Lösung zu bringen. Getestet wurden Tetrahydrofuran (THF), 3-Pentanon, Diethylether, Acetonitril (ACN), Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Aceton, Polyethylenglykol (PEG) 400, Ethylenglykol, Ethylacetat, Kohlenstoffdisulfid (CS_2), Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) und *tert*-Butanol. Bevor die Stoffe für Enzymaktivitätstests verwendet wurden, wurden UV-Vis-Spektren aufgenommen um sicherzustellen, dass die Stoffe nicht in dem Bereich absorbieren, in dem die Enzymaktivität photometrisch verfolgt wird (siehe Material und Methoden). Die folgenden Stoffe zeigten eine hohe Absorption im Messbereich des Enzym-

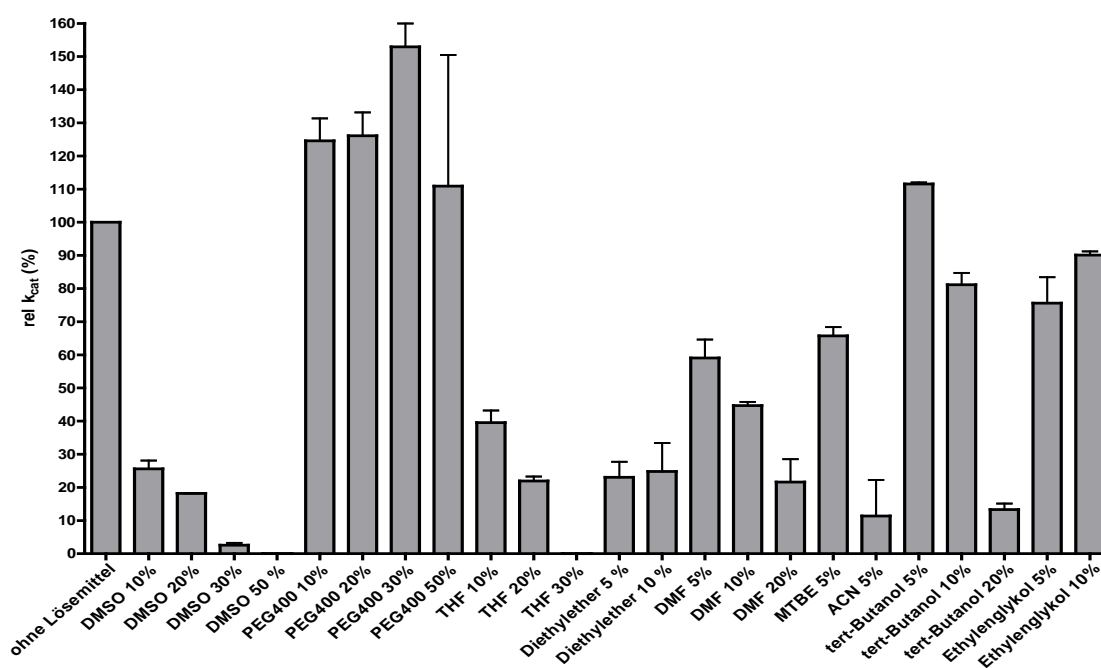


Abb. 11: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener organischer Lösungsmitteln auf die Aktivität der EbDH.

tests oder führten wegen ihrer ungenügenden Wasserlöslichkeit zu Eintrübung und konnten deshalb nicht verwendet werden: 3-Pentanon, Aceton, Ethylacetat und CS_2 . Die restlichen Lösungsmittel wurden in Konzentrationen von 5% bis 50% im EbDH Enzymtest (siehe Material und Methoden) eingesetzt und die Enzymaktivität mit Ethylbenzol bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 relativ zum Standardtest gezeigt. Die Lösemittel, die einen positiven Einfluss auf die Aktivität der EbDH hatten, waren PEG400 (alle eingesetzten Konzentrationen) und *tert*-Butanol (bei 5 % Endkonzentration). Insbesondere die Zugabe von 30 % PEG400 erhöhte die Aktivität signifikant (150 %, siehe Abb. 11) und selbst bei Zugabe von 50 % PEG400 betrug die Enzymaktivität noch 110 %. Neben den positiven Effekten von PEG400 und *tert*-Butanol zeigte die Zugabe von 10 % Ethylenglykol zumindest keinen stark negativen Einfluss auf die Enzymaktivität sodass alle drei Lösemittel in ihren jeweiligen spezifischen Konzentrationen als Additive für einen enzymatischen Umsatz im technischen Maßstab verwendet werden könnten. Die restlichen getesteten Lösemittel bewirkten allesamt einen Aktivitätsverlust von 30 % bis zu 95 % auch wenn sie nur in geringen Konzentrationen zugegeben wurden und erscheinen daher als Additive ungeeignet (Abb. 11). Die absoluten Werte aller ermittelten Enzymaktivitäten befinden sich in Tabelle 10 im Anhang. Zur Überprüfung, in wie weit die Zugabe der Lösungsmittel die Löslichkeit von Substraten tatsächlich erhöhen kann, wurde Ethylbenzol als Modellsupstrat in verschiedenen Konzentrationen jeweils ohne und mit 50% PEG400 in 100 mM Tris/Cl Puffer gelöst, die Küvetten zur Entfernung eines möglichen Niederschlags bzw. ungelösten Ethylbenzols zentrifugiert. Anschließend wurden die Absorptionsspektren der Lösungen aufgenommen und ausgewertet. Ethylbenzol zeigte dabei bei 260 nm und 267 nm eine charakteristische Absorption. Die Extinktion bei diesen Wellenlängen wurde dann für ansteigende eingesetzte Ethylbenzolkonzentrationen bestimmt (siehe Abb. 12 A). Dabei ist zu erkennen, dass ohne Hinzugabe von 50 % PEG400 die Extinktionen der Lösungen bei eingesetzten Konzentrationen von mehr als 2 mM Ethylbenzol nicht mehr ansteigen. Dies bedeutet, dass in wässriger Lösung nicht mehr als 2 mM Ethylbenzol gelöst werden können. Die Extinktionen der Lösungen, denen 50 % PEG400 zugegeben wurden, steigen jedoch bis zu einer eingesetzten Konzentration von 8 mM Ethylbenzol weiter an. Durch Hinzugabe von 50% PEG400 kann also die Konzentration von gelöstem Ethylbenzol auf 8 mM erhöht werden. Damit ein vollständiger Umsatz von Ethylbenzol in einem technischen Prozess gewährleistet ist, müsste Ferriceniumtetrafluoroborat in der doppelten Konzentration (16 mM) eingesetzt werden. Zur Überprüfung der Löslichkeit wurde Ferriceniumtetrafluoroborat in ansteigenden Konzentrationen in 100 mM Tris/Cl gelöst und die Absorption bei 645 nm und 650 nm bestimmt (siehe Abb. 12 B). Die Daten zeigen, dass Ferriceniumtetrafluoroborat bis zu einer Konzentration von 16 mM in wässriger Lösung eingesetzt werden kann. Hinzugabe von 50 % PEG400 führte nicht zu einer Erhöhung der Löslichkeit (Daten nicht gezeigt).

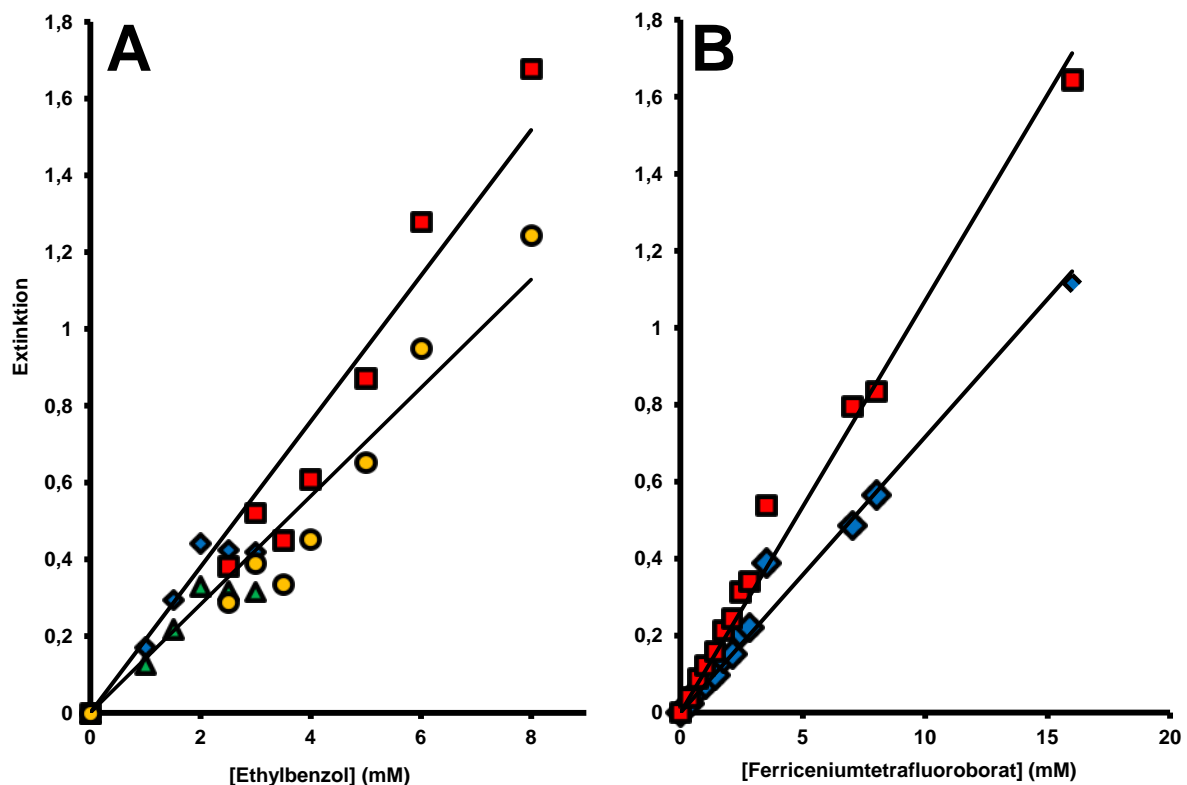


Abb. 12: Extinktionen unterschiedlicher Konzentrationen von Ethylbenzol und Ferriceniumtetrafluoroborat in wässriger Lösung. A: Extinktionen von Lösungen mit verschiedenen Ethylbenzol-Konzentrationen ohne Zugabe von 50 % PEG400 bei 260 nm (blaue Dreiecke) und 267 nm (grüne Dreiecke) und mit Hinzugabe von 50 % PEG400 bei 260 nm (rote Quadrate) und 267 nm (gelbe Kreise). Lineare Regressionsgeraden wurden nur für die Extinktionswerte der Lösungen mit PEG400 erstellt. B: Extinktion von Ferriceniumtetrafluoroborat in wässriger Lösung bei 645 nm (rote Quadrate) und 650 nm (blaue Dreiecke).

3.2 Kaliumferricyanid als alternativer Elektronenakzeptor

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase wird der artifizielle Elektronenakzeptor Ferriceniumtetrafluoroborat (FcBF_4) verwendet (Kniemeyer und Heider, 2001; Szaleniec et al., 2007). Die Oxidation von Substraten wird dabei an die Reduktion des Ferriceniumkations zu Ferrocen gekoppelt und bei 290 nm verfolgt. Aufgrund der Absorption einiger EbDH Substrate in diesem Wellenlängenbereich und der mangelnden Stabilität von Ferriceniumtetrafluoroborat in wässriger Lösung mit neutralem pH Wert, wurde Kaliumferricyanid (auch: Kaliumhexacyanoferrat; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) als alternativer Elektronenakzeptor getestet. Kaliumferricyanid besitzt ein ähnliches Standardredoxpotential wie Ferriceniumtetrafluoroborat ($E^\circ = 436 \text{ mV}$ bzw. $E^\circ = 380 \text{ mV}$) aber eine weit höhere Löslichkeit in Wasser (bis zu 1 M bzw. 16 mM). Die Enzymaktivität mit Kaliumferricyanid wurde bei 420 nm photometrisch mit je 100 μM Ethylbenzol, 3-Phenyl-1-Propen und 3-Phenyl-1-Propin als alternativen Substraten verfolgt (siehe Material und Methoden) und

zeigte enzymatischen Umsatz aller getesteten Substrate. Die berechneten Enzymaktivitäten lagen dabei in ähnlichen Bereichen wie die Werte die mit Ferricenium als Elektronenakzeptor erhalten wurden. Die apparenten K_m Werte für Kaliumferricyanid betrugen 28 μM für Ethylbenzol, 360 μM für 3-Phenyl-1-Propen und 400 μM für 3-Phenyl-1-Propin) und sind damit drei bis 20-mal höher als die jeweiligen apparenten K_m Werte für Ferricenium (9,8 μM mit Ethylbenzol, 18 μM mit 3-Phenyl-1-Propen und 35 μM mit 3-Phenyl-1-Propin). Siehe dazu auch Tabelle 3 und Abbildung 27 im Anhang.

Tab. 3: Vergleich der apparenten enzymkinetischen Parameter von Ferricenium-tetrafluoroborat und Kaliumferricyanid mit verschiedenen Kohlenwasserstoffsubstraten

	Ethylbenzol		3-Phenyl-1-Propen		3-Phenyl-1-Propin	
	FcBF_4	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	FcBF_4	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	FcBF_4	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
k_{cat}^*	$0,27 \pm 0$	$0,17 \pm 0$	166 ± 2	331 ± 9	185 ± 16	220 ± 16
$K_m(\text{app}) (\mu\text{M})$	$9,8 \pm 1,6$	28 ± 4	18 ± 1	362 ± 30	35 ± 11	400 ± 108

* k_{cat} Werte für Ethylbenzol sind in s^{-1} , k_{cat} Werte für 3-Phenyl-1-Propen und 3-Phenyl-1-Propin in rel. k_{cat} (%) von Ethylbenzol angegeben.

4. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase

4.1 Ermittlung der Enzymkinetik

Bei der von der EbDH katalysierten Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol werden zwei Elektronen von Ethylbenzol auf den MoCo und weiter auf die Eisen-Schwefel-Cluster bis hin zur Hämgruppe des Enzyms übertragen. Von dort aus werden die Elektronen vermutlich auf ein Cytochrom *c* übertragen welches die Elektronen in die Atmungskette einspeist (Kniemeyer und Heider, 2001). Im photometrischen Enzymtest der EbDH wird dieser unbekannte natürliche Elektronenakzeptor durch künstliche Elektronenakzeptoren wie das Ferricenium-Kation von Ferriceniumtetrafluoroborat (FcBF_4) oder das Fe(III) von Ferricyanid ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) ersetzt. Da das Ferricenium-Kation oder das Fe(III) Ein-Elektronen-Überträger sind, werden durch die Oxidation ein Ethylbenzolmoleküls (oder eines anderen monoethyl- bzw. monopropyl-substituierten Substratanalogs) zwei Moleküle des respektiven Elektronenakzeptors reduziert. In Bezug auf den Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase sind für diese Mehrsubstratreaktion (Kohlenwasserstoffsubstrate=Substrat 1; Elektronenakzeptoren=Substrat 2) zwei kinetische Modelle denkbar, nämlich i.) eine sequenzieller Mechanismus oder Ping-Pong Mechanismus oder ii.) ein geordneter

Mechanismus oder Ternärkomplex Mechanismus. Wegen des extrem niedrigen K_m -Werts für Ethylbenzol (Kniemeyer und Heider, 2001; Szaleniec et al., 2007) waren die Untersuchungen zur Enzymkinetik der EbDH bisher sehr schwierig und nur bedingt zuverlässig. Zur Bestimmung des kinetischen Modells wurden deshalb enzymatische Tests mit zwei alternativen Kohlenwasserstoffsubstraten und den zwei verfügbaren künstlichen Elektronenakzeptoren FcBF_4 (Ferriceniumkation) und $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($\text{Fe}(\text{III})$) durchgeführt. Als Kohlenwasserstoffsubstrate wurden 3-Phenyl-1-propen (Allylbenzol) und 3-Phenyl-1-propin ausgewählt. Diese Substrate besitzen im Vergleich zu Ethylbenzol einen hohen relativen k_{cat} Wert sowie einen relativ hohen K_m Wert (Knack et al., 2012) was die Qualität der Messwerte erhöhen und die Bestimmung der kinetischen Parameter erleichtern sollte. Es wurden insgesamt 10 enzymatische Tests (siehe Material und Methoden) mit jeweils bis zu 10 unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Substrats in Abhängigkeit von bis zu drei verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Elektronenakzeptors durchgeführt. Eine erste kinetische Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Dabei wurde jeder Datensatz (erhalten durch Verwendung einer Elektronenakzeptorkonzentration mit bis zu 10 Kohlenwasserstoffsubstratkonzentrationen) für sich alleine, nicht-linear an die Michaelis Menten Gleichung angepasst (siehe Abb. 28 im Anhang). Die Daten zeigen, dass die apparenten relativen k_{cat} (rel. k_{cat} app) Werte der Kohlenwasserstoffsubstrate kleiner werden, je weniger vom Elektronenakzeptor im Test eingesetzt wird und umgekehrt (siehe Tab. 11 im Anhang). Die apparenten K_m (K_m app) Werte der Kohlenwasserstoffsubstrate ändern sich in Abhängigkeit unterschiedlicher Elektronenakzeptorkonzentrationen jedoch nicht signifikant. Eine umfangreichere kinetische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm LEONORA (Cornish-Bowden, 1995). Im Gegensatz zur Analyse mit GraphPad Prism wurden hierbei alle Datensätze gemeinsam mit Hilfe der Gleichungen für das jeweilige kinetische Modell (Ping-Pong oder Ternärkomplex) angepasst. Bei der Auswertung ergeben sich dabei als Parameter die realen K_m Werte (K_m real) für beide Substrate (Kohlenwasserstoff (A) und Elektronenakzeptor (B)) und für das Ternärkomplex-Modell zusätzlich die Dissoziationskonstante des Ternärkomplexes (K_{AB}). Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 4 und 5 aufgelistet. Ein Vergleich der Daten zeigt, dass die realen k_{cat} Werte und die realen K_m Werte für Substrat A und B bei beiden Modellen nahezu identisch sind. Im Vergleich zu den apparenten Werten sind die realen k_{cat} Werte stark erhöht, die realen K_m Werte nur leicht erhöht (siehe Tab. 12 im Anhang). Die K_{AB} Werte die ausschließlich aus den Berechnungen für das Ternärkomplex-Modell stammen, weisen sehr hohe Standardabweichungen auf. Aus diesem Grund wurde das Ternärkomplex-Modell als unplausibel zur Beschreibung des Reaktionsmodells der EbDH betrachtet und daher nicht weiter verfolgt. Mit den enzymkinetischen Parametern die aus den Berechnungen für das Ping Pong Modell stammen, der reziproken Form der Gleichung für das Ping Pong Modell

und mit Hilfe des Programm GraphPad Prism wurden anschließend theoretische Regressionsgeraden simuliert. Diese liegen parallel zueinander. Anschließend wurden die Enzymaktivitäten in doppelt reziproker Form aufgetragen (siehe Abb. 13). Dabei wird deutlich, dass die enzymkinetischen Daten auf den simulierten Regressionsgeraden liegen. Das Ping Pong Modell erscheint daher als geeignet zur Beschreibung des Reaktionsmodells der EbDH.

Tab. 4: Enzymkinetische Parameter für das Ping-Pong Modell

Substrat A	3-Phenyl-1-propen		3-Phenyl-1-propin	
Substrat B	FcBF ₄	K ₃ Fe(CN) ₆	FcBF ₄	K ₃ Fe(CN) ₆
rel. k_{cat} (real)	660 % ± 73	590 % ± 46	350 % ± 16	430 % ± 33
K_{mA} (real)	12 ± 3 µM	18 ± 2 µM	24 ± 2 µM	19 ± 3 µM
K_{mB} (real)	180 ± 30 µM	1,9 ± 0,2 mM	37 ± 5 µM	1,1 ± 0,2 mM

Tab. 5: Enzymkinetische Parameter für das Ternärkomplex-Model

Substrat A	3-Phenyl-1-propen		3-Phenyl-1-propin	
Substrat B	FcBF ₄	K ₃ Fe(CN) ₆	FcBF ₄	K ₃ Fe(CN) ₆
rel. k_{cat} (real)	580 % ± 84	530 % ± 40	310 % ± 14	430 % ± 42
K_{mA} (real)	7,8 ± 4,2 µM	12 ± 3 µM	17 ± 2 µM	19 ± 4 µM
K_{mB} (real)	150 ± 36 µM	1,5 ± 0,2 mM	23 ± 5 µM	1,1 ± 0,2 mM
K_{AB}	390 ± 330 µM	5,3 ± 2,0 mM	404 ± 130 µM	49 ± 2200 µM

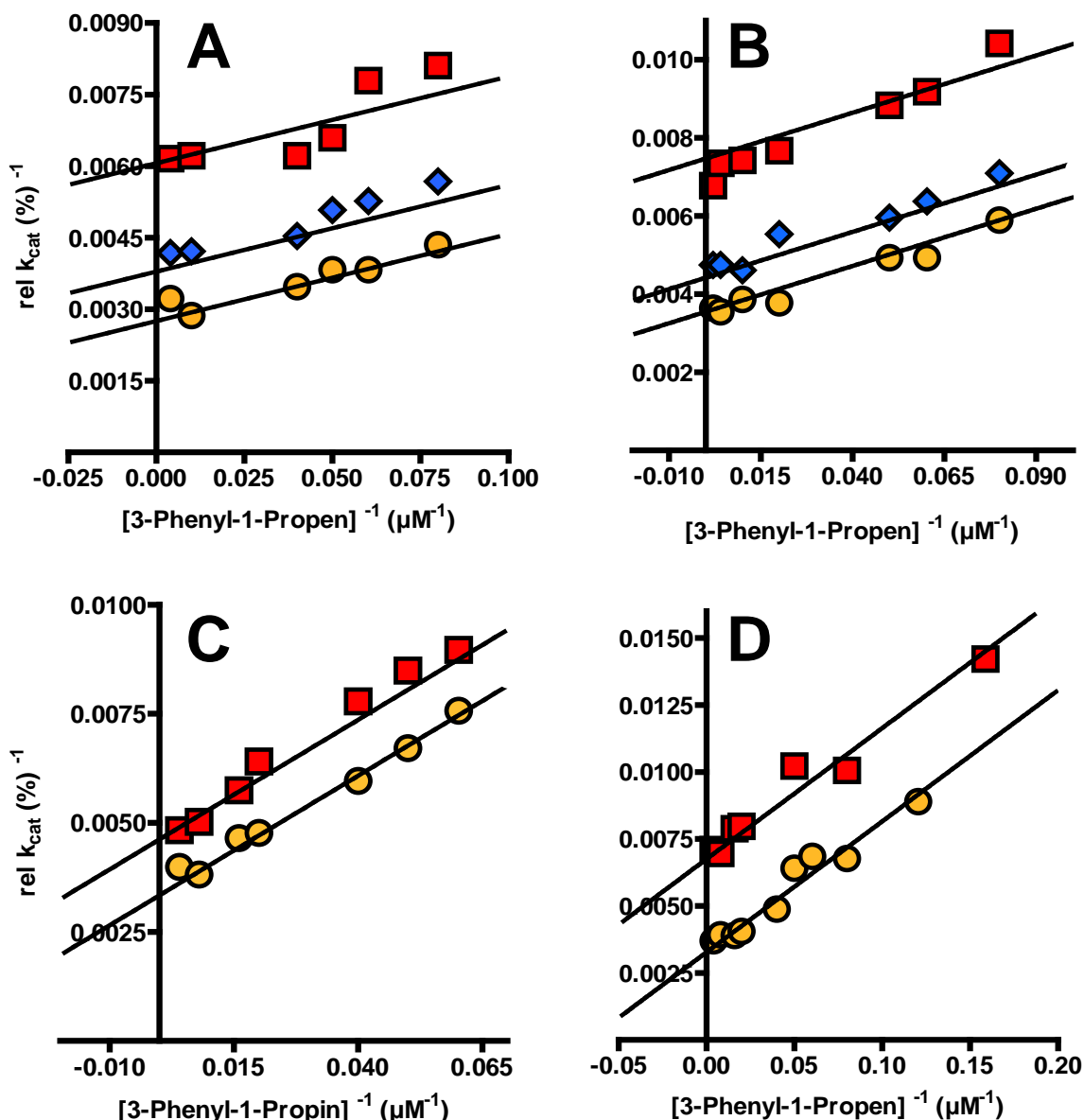


Abb. 13: Doppelt reziproker Auftrag von Enzymaktivitäten von 3-Phenyl-1-Propen und 3-Phenyl-1-Propin in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von Ferriceniumtetrafluorborat (FcBF₄) und Ferricyanid (K₃Fe(CN)₆). A: Datensatz für 3-Phenyl-1-Propen mit 60 μM FcBF₄ (Quadrate), 120 μM FcBF₄ (Rauten) und 200 μM FcBF₄ (Kreise). B: Datensatz für 3-Phenyl-1-Propen mit 0,56 mM K₃Fe(CN)₆ (Quadrate), 1,2 mM K₃Fe(CN)₆ (Rauten) und 1,7 mM K₃Fe(CN)₆ (Kreise). C: Datensatz für 3-Phenyl-1-Propin mit 60 μM FcBF₄ (Quadrate) und 200 μM FcBF₄ (Kreise). D: Datensatz für 3-Phenyl-1-Propin mit 0,56 mM K₃Fe(CN)₆ (Quadrate) und 2,3 mM K₃Fe(CN)₆ (Kreise).

4.2 Untersuchung der Enantioselektivität der C-H Spaltung

Der erste Schritt der Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol durch die Ethylbenzol Dehydrogenase umfasst die Spaltung einer C-H Bindung am C1 Atom des Ethylsubstituenten von Ethylbenzol sowie den anschließenden Transfer von zwei Elektronen

zum MoCo. Es ist jedoch bisher nicht nachgewiesen welches der beiden Wasserstoffatome der Methylengruppe mitsamt seiner Elektronen abstrahiert wird. Denkbar wären eine zufällige, unselektive Abstraktion von einem der Wasserstoffe am C1 Atom oder eine gerichtete, enantioselektive Abstraktion des *pro(S)* oder *pro(R)* Wasserstoffatoms. Zur Untersuchung der Enantioselektivität der C-H Spaltung durch die Ethylbenzol Dehydrogenase wurden in dieser Arbeit Ethylbenzolderivate synthetisiert die jeweils ein Deuteriumatom am C1 Atom des Ethylsubstituenten in *pro(S)* oder *pro(R)* Stellung tragen. Ist die EbDH enantioselektiv für eines der Stereoisomere, sollte über die Bestimmung der Enzymaktivität ein kinetischer Isotopeneffekt (KIE) zu messen sein.

4.2.1 Synthese und Analyse von spezifisch deuterierten Ethylbenzolderivaten

Die Synthese der deuterierten Ethylbenzolderivate erfolgte nach einer modifizierten Methode von Holland et al. (1988) (siehe Material und Methoden 6.1). Als Ausgangsmaterial wurden jeweils (*R*)- oder (*S*)-1-Phenylethanol verwendet. Im ersten Schritt wurden die Ausgangsmaterialien durch Thionylchlorid zu (*R*)- bzw. (*S*)-1-Chloroethylbenzol umgesetzt. Die Substitution der Hydroxylgruppe durch ein Chloratom erfolgte dabei unter Retention der optischen Konfiguration (S_Ni -Reaktion). Im zweiten Schritt wurden die Chlorintermediate durch Lithiumtriethylbordeuterid (für (*R*)-1-Chloroethylbenzol) bzw. Lithiumaluminiumdeuterid (für (*S*)-1-Chloroethylbenzol) zu den deuterierten Analoga reduziert. Dabei erfolgte in einer S_N2 -Reaktion eine Substitution des Chloratoms durch ein Deuteriumatom unter Inversion der optischen Konfiguration. Die Syntheseprodukte wurden anschließend destilliert um sie von nicht reagiertem Ausgangsmaterial zu trennen (siehe Material und Methoden 6.2). Die chlorierten Intermediate sowie die deuterierten Endprodukte wurden per NMR charakterisiert (siehe Material und Methoden 5.3 und Abb. 29 und 30 im Anhang). Die Überprüfung der Enantiomerenreinheit der synthetisierten Substanzen durch circular dichroism (CD)-Spektroskopie (AG Marahiel, FB Chemie, Uni Marburg) oder vibrational circular dichroism (VCD)-Spektroskopie (AG Pecul-Kudelska, Fb Chemie, Uni Warschau) führte leider zu keinem eindeutigen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Es konnte aber ausgesagt werden, dass der Enantiomerenanteil für jeweils eines der beiden Enantiomere in beiden Endprodukten ca. 55–60% beträgt. Es konnte jedoch nicht bestimmt werden, um welches Enantiomer es sich jeweils dabei handelt. Da Holland et al. in ihrer Arbeit ebenfalls Enantiomerenanteile in dieser Größenordnung festgestellt haben (66% für (*S*)-[1- 2H_1]-Ethylbenzol und 60% für (*R*)-[1- 2H_1]-Ethylbenzol im jeweiligen Stoffgemisch) wird jedoch davon ausgegangen, dass es sich bei den im Überschuss vorhandenen Enantiomeren um die gewünschten Enantiomere handelt.

Zur Verifizierung der angenommenen Enantiomerenverhältnisse wurden mit beiden Stoffgemischen enzymatische Umsetzungen durchgeführt und die Produkte analysiert. Dazu

wurden von beiden Stoffgemischen je 0,1 mM mit je 0,5 mM Ferriceniumtetrafluoroborat und 500 µg EbDH inkubiert. Die Reaktion wurde photometrisch verfolgt und nach dem Ende der enzymatischen Reaktion die Produkte extrahiert und mit GC-MS analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 festgehalten. Die Ergebnisse zeigen die Abundanz verschiedener Derivate von (S)-1-Phenylethanol (Abb. 14) und deren Verhältnis zueinander in den einzelnen Reaktionsansätzen. Dabei zeigte die Referenzmessung der Reaktion mit Ethylbenzol einen Anteil von „schweren“ (S)-1-Phenylethanol (123 m/z) von 11,9 % gegenüber „leichtem“ (S)-1-Phenylethanol (122 m/z) von 88,1%. Dieser Wert liegt in etwa im Bereich der natürlichen Verteilung des Kohlenstoffisotops ^{13}C der mit (S)-1-Phenylethanol erwartet werden kann (ca. 8,8 %). Die Messung des Reaktionsansatzes mit vollständig deuteriertem $[\text{}^2\text{H}_{10}]$ Ethylbenzol zeigte ebenfalls einen Wert der im Bereich dieser natürlichen Kohlenstoffisotopenverteilung liegt (Anteil des schwereren Produktes: 9,7 %). Im Reaktionsansatz von (R)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol betrug der Anteil des „schweren“ (S)-1-Phenylethanol jedoch 59,6%, im Reaktionsansatz von (S)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol 42,0% (siehe Tab. 6). Verantwortlich für den hohen Anteil an „schweren“ Produkten war hierbei nicht der ^{13}C Kohlenstoff sondern die Deuteriumatome die im Endprodukt vorhanden waren. Durch den Abzug des Anteils des ^{13}C Kohlenstoffs (11,9%), ergeben sich die bereinigten Werte von 47,6% für das schwere Produkt im Ansatz von (R)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol und 30,1% für das schwere Produkt im Ansatz von (S)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol. Diese Werte wurden anschließend zu den Werten der leichten Produkte addiert und diese Summe als 100% definiert. Die somit korrigierten Werte ergeben einen Anteil von 54% für das schwere Produkt im Ansatz von (R)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol und 34% für das schwere Produkt im Ansatz von (S)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol (Tab. 6). Da vermutet wurde dass die EbDH enantioselektiv für die Abspaltung des *pro*(S) Wasserstoffatoms bzw. *pro*(S) Deuteriumatoms ist, erklärt sich das im Ansatz von (R)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol ein Überschuss von deuteriertem (S)-1-Phenylethanol vorhanden war (siehe auch Abb. 14). Mit dem Stoffgemisch von (S)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol verhielt es sich genau umgekehrt. Hier wurden die im Überschuss vorhandenen, in der (S)-Position deuterierten Ethylbenzole zum undeuterierten (S)-1-Phenylethanol umgesetzt. Ausgehend von dieser Produktanalyse muss also der Anteil des (R) Enantiomers im Stoffgemisch von (R)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol in etwa 54 % sowie der Anteil des (S) Enantiomers im Enantiomerengemisch von (S)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol 66 % betragen. Die Ergebnisse der Produktanalyse liegen damit in etwa im Bereich der Ergebnisse der CD bzw. VCD Analyse und den Literaturwerten von Holland et al. (1988).

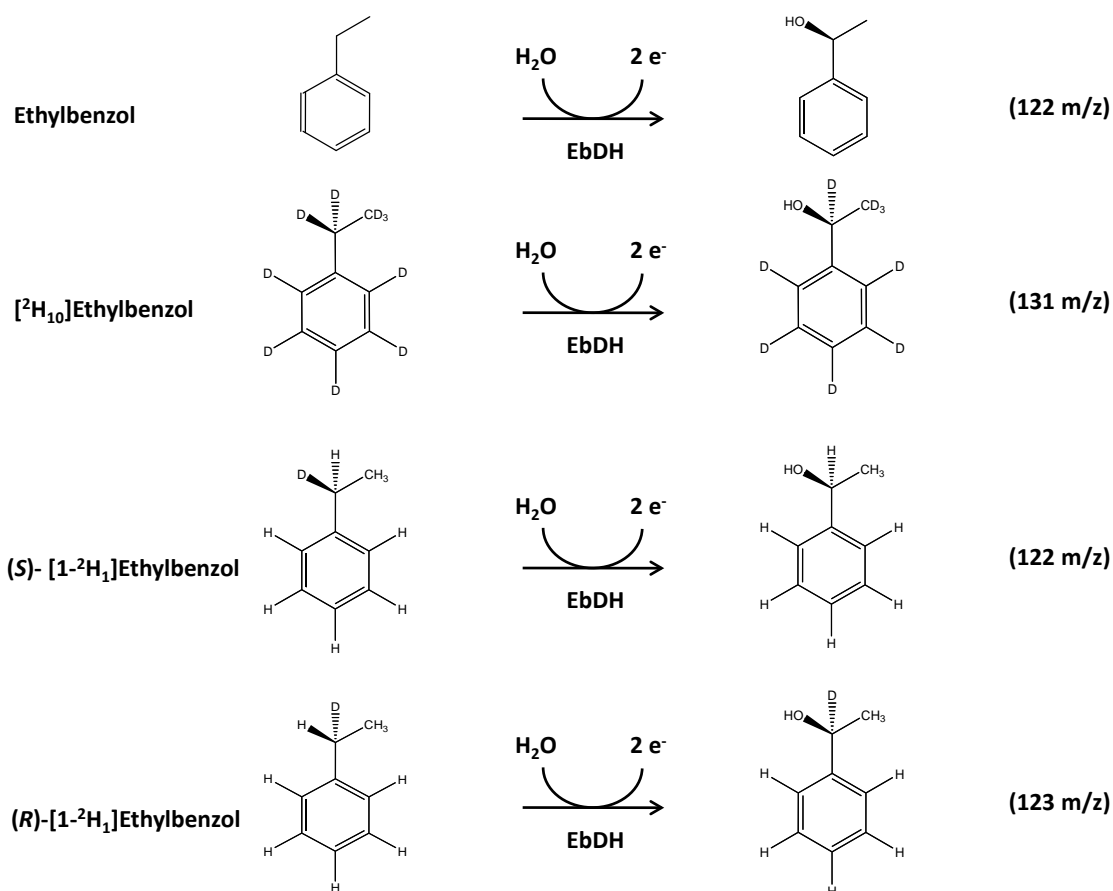


Abb. 14: Erwartete Produkte des enzymatischen Umsatzes von Ethylbenzol, [²H₁₀]-Ethylbenzol, (R)-[1-²H₁]-Ethylbenzol und (S)-[1-²H₁]-Ethylbenzol mit EbDH

Tab. 6: Massenspektrometrische Analyse von Umsetzungen der synthetisierten deuterierten Ethylbenzole mit EbDH*

Reaktionsansatz	Produkte	Abundanz*	Anteil	¹³ C korr. Anteil	korr. Anteil (100%)
Ethylbenzol	122 m/z	3575	88,1 %	na	-
	123 m/z	483	11,9 %	na	-
[² H ₁₀]-Ethylbenzol	131 m/z	1253	90,3 %	na	-
	132 m/z	134	9,7 %	na	-
(R)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol	122 m/z	1680	40,5 %	na	46 %
	123 m/z	2469	59,5 %	47,6 %	54 %
(S)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol	122 m/z	1911	58,0 %	na	66 %
	123 m/z	1381	42,0 %	30,1 %	34 %

*Die dazugehörigen Massenspektren sind im Anhang in Abbildung 31 aufgeführt; na=nicht anwendbar

4.2.2 Bestimmung der Enzymaktivität der spezifisch deuterierten Ethylbenzolderivate und des primären kinetischen Isotopeneffekts (KIE)

Zur Bestimmung des kinetischen Isotopeneffekts (Quotient aus den Enzymaktivitäten einer nicht deuterierten Substanz und eines deuterierten Derivats; K_H/K_D) wurde die Enzymaktivität mit den spezifisch deuterierten Substrate bestimmt und mit Kontrollversuchen mit nicht deuteriertem und vollständig deuteriertem Ethylbenzol verglichen (siehe Material und Methoden). Es wurden insgesamt drei unabhängige Enzymtests mit Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt und der statistische Mittelwert inklusive der Standardabweichung berechnet. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 7 aufgeführt. Als Negativkontrolle diente Ethylbenzol (mit einer natürlichen Isotopenverteilung) und als Positivkontrolle vollständig deuteriertes [$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol (dabei sind primäre und sekundäre kinetischer Isotopeneffekte zu erwarten). Der gemessene KIE von (*R*)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol lag dabei bei 2,1 während der KIE von (*S*)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol bei 3,2 lag. Für [$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol wurde ein KIE von 27 erhalten.

Tab. 7: Enzymaktivitäten und kinetische Isotopeneffekte (KIE) der deuterierten Ethylbenzolderivate im Vergleich zu undeuteriertem Ethylbenzol und vollständig deuteriertem Ethylbenzol ([$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol)

Substrat	Enzymaktivität (nmol/mg/min)	Relative Enzymaktivität (%)	Kinetischer Isotopeneffekt (KIE; K_H/K_D)
Ethylbenzol	59 ± 8	100 ± 14	1,0 ± 0,1
[$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol	2,2 ± 1,4	3,7 ± 2,2	27 ± 17
(<i>R</i>)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol	28 ± 3	47 ± 2	2,1 ± 0,1
(<i>S</i>)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol	19 ± 2	32 ± 2	3,2 ± 0,2

4.3. Untersuchung einer möglichen Alken-Hydrataseaktivität der EbDH

Die Ethylbenzol Dehydrogenase katalysiert die Hydroxylierung einer Vielzahl von aromatischen Kohlenwasserstoffen die von Ethylbenzol abgeleitet sind. In früheren Arbeiten (Johnson et al., 2001; Szaleniec et al., 2007) wurde außerdem festgestellt, dass das Enzym eine nicht aromatische Alkenverbindung (Ethylidencyclohexan) zu mehreren unbekannten Alkoholen umsetzt. Eines der per Massenspektrometrie identifizierten Produkte ist dabei möglicherweise das Produkt einer Wasseraddition an die Alkendoppelbindung (Szaleniec et al., 2007), was auf eine mögliche Seitenaktivität der EbDH als Alken-Hydratase schließen ließ. In der vorliegenden Dissertation sollte diese vermutete Hydrataseaktivität der EbDH

weiter untersucht und mit weiteren Alken- bzw. Alkinsubstraten überprüft werden. Dazu wurden mehrere solcher Substrate (Endkonzentration 100 μM) in anaeroben Reaktionsansätzen mit zugegebener EbDH (siehe Material und Methoden) ohne Zugabe artifizierender Elektronenakzeptoren über Nacht inkubiert. Zur Eliminierung möglicher Hydroxylierungsaktivitäten durch noch vorhandene Oxidationsmittel in der Enzympräparation wurde das Enzym bzw. der Molybdäncofaktor durch vorherige Zugabe von 1 mM Natriumdithionit und eine 5-minütige Inkubation vollständig reduziert. Die Ansätze wurden am nächsten Tag mit Ethylacetat extrahiert und mit GC-MS analysiert (siehe Material und Methoden). Die vermutete Hydrataseaktivität der EbDH sollte dabei zur teilweisen Konversion der Alkene zu Alkoholen führen, konnte aber weder für Ethylidencyclohexan noch für eines der anderen Substrate nachgewiesen werden (Abb. 15)

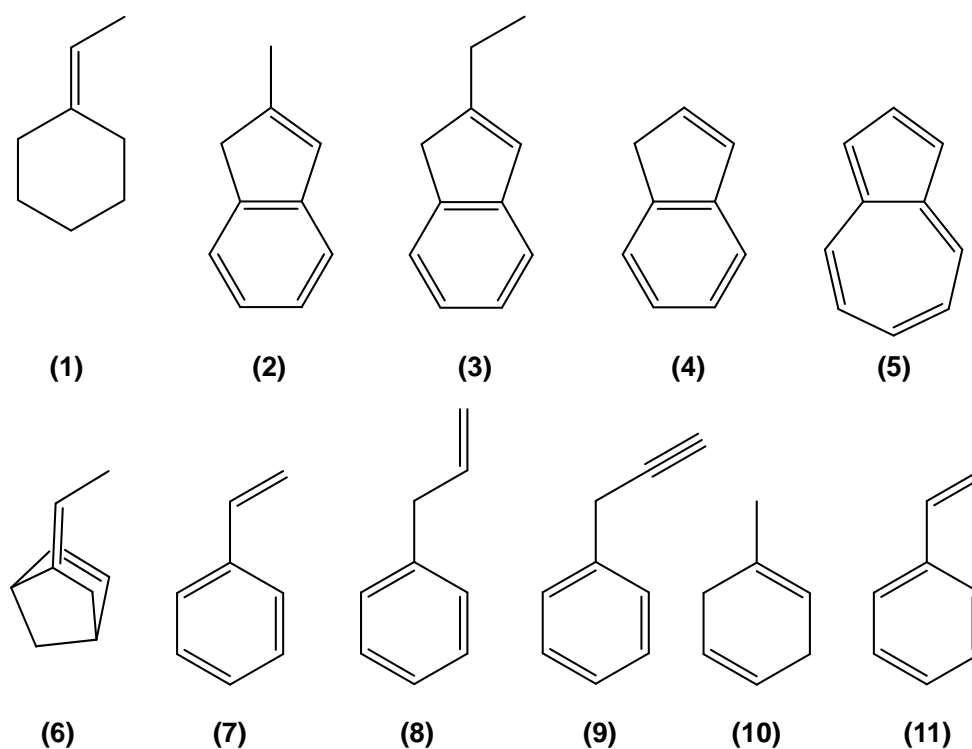


Abb. 15: Getestete Alken- bzw. Alkinverbindungen zur Untersuchung der vermuteten Hydrataseaktivität der EbDH. (1) Ethylidencyclohexan, (2) 2-Methyl-1*H*-Inden, (3) 2-Ethyl-1*H*-Inden, (4) Inden, (5) Azulen, (6) 5-Ethylidene-2-Norbornen, (7) Styrol, (8) 3-Phenyl-1-propen; (9) 3-Phenyl-1-Propin; (10) 1-Methyl-1,4-Cyclohexadien, (11) *trans*- β -Methylstyrol

5. Anaerober Abbau von Alkanen in *Desulfococcus oleovorans*

5.1 Analyse von Alkan-induzierten Proteinen und Wachstumsversuche auf möglichen Stoffwechselintermediaten

Der anaerobe Abbau von Alkanen in *D. oleovorans* wird nicht durch die Addition von Fumarat an das C2 Atom der Alkankette eingeleitet, sondern durch eine bisher unbekannte Initialreaktion. Zur Identifizierung dieser Initialreaktion bzw. zur Identifizierung eines neuartigen Abbauweges wurde *D. oleovorans* in der vorliegenden Dissertation auf Hexadecan, 1-Hexadecanol, 2-Hexadecanol und Palmitat (Kontrolle) als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert (Material und Methoden und Abb. 16). Der Zellextrakt von gewachsenen Kulturen die auf Hexadecan und Palmitat kultiviert wurden, wurde anschließend auf induzierte Proteine untersucht. Dazu wurden die Kulturen geerntet, die Zellen mit einer Kugelmühle aufgeschlossen (siehe Material und Methoden) und der Zellextrakt per SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert (Abb. 17). Im Zellextrakt der auf Hexadecan gewachsenen Kulturen konnten dabei drei induzierte Proteinbanden mit apparenten molekularen Massen von ca. 120, 50 und 25 kDa identifiziert werden, die im Zellextrakt von auf Palmitat gewachsenen Kulturen fehlten. Zur weiteren Analyse wurden die

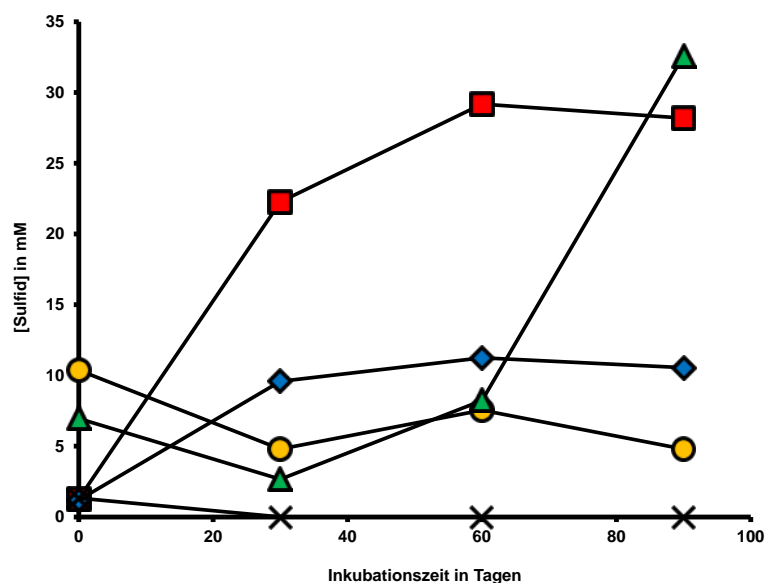


Abb. 16: Wachstumskurven von *D. oleovorans* Kulturen auf unterschiedlichen Kohlenwasserstoffsubstraten. Palmitat (rote Quadrate), Hexadecan (blaue Rauten), 2-Hexadecanol (grüne Dreiecke), 1-Hexadecanol (gelbe Kreise) und Kontrolle ohne Substrat (Kreuze).

induzierten Proteinbanden der Hexadecankulturen aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels nanoHPLC gekoppelt mit MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert (Dr. Baumeister, AG Lingelbach, Uni Marburg; siehe Material und Methoden). Die induzierten

Proteine wurden als die drei Untereinheiten (α , β und γ) eines EbDH-ähnlichen Molybdänenzym identifiziert und deren exakte molekulare Masse bestimmt (siehe Tab. 8). Als Kontrolle wurden Gelstücke aus der Spur der auf Palmitat gewachsenen Kulturen ausgeschnitten die in etwa die Bereiche mit der gleichen apparenten molekularen Masse abdecken und auf die gleiche Weise analysiert. Dabei konnten die Untereinheiten des EbDH-ähnlichen Enzyms nicht nachgewiesen werden. Weil das EbDH-ähnliche Enzym in den auf Hexadecan gewachsenen Kulturen stark induziert ist, könnte eine Hydroxylierung der Alkankette durch das EbDH-ähnliche Enzym als mögliche Initialreaktion des Abbaufweges postuliert werden. Da dies bereits aufgrund genomischer Untersuchungen vermutet wurde, wurde getestet, ob *D. oleovorans* auch auf den entsprechenden Alkoholintermediaten 1-Hexadecanol und 2-Hexadecanol wächst (siehe Abb. 16). Dabei wurde ein Wachstum von *D. oleovorans* auf 2-Hexadecanol festgestellt, nicht jedoch auf 1-Hexadecanol.

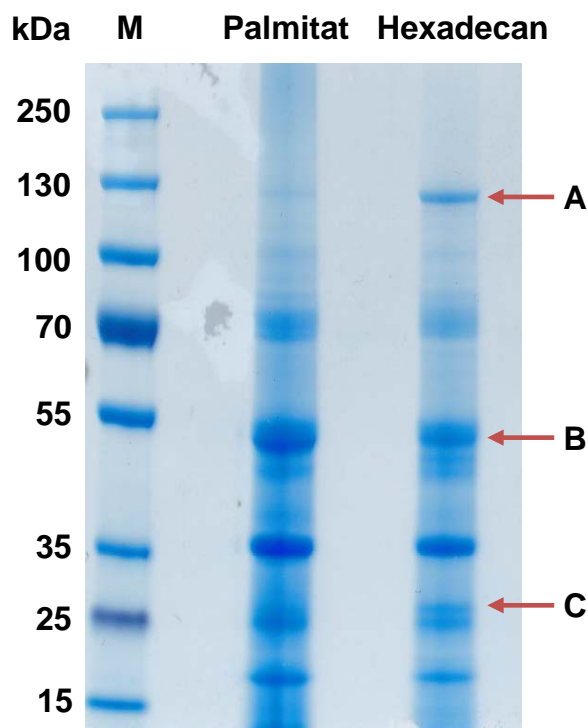


Abb. 17: SDS-PAGE Analyse von *D. oleovorans* Zellextrakt. Zur Analyse von induzierten Proteinen von auf Hexadecan gewachsenen Kulturen wurden 15 μ g des Gesamtproteins des Zellextrakts elektrophoretisch auf einen Novex NuPAGE Bis-Tris Mini-Gradientengel (4 – 20 %) aufgetrennt. Die mit den roten Pfeilen markierten Proteinbanden wurden aus dem Gel geschnitten und massenspektrometrisch analysiert und als Untereinheiten (α , β und γ) eines EbDH-ähnlichen Enzyms identifiziert. Als Kontrolle wurde der Zellextrakt von auf Palmitat gewachsenen Kulturen aufgetragen. Dort konnten die Untereinheiten des Enzyms nicht identifiziert werden.

Tab. 8: Analyse der induzierten Proteine der auf Hexadecan kultivierten *D. oleovorans* Kulturen.

Induzierte Proteinbande; Name	Accession number	Gen	Molekulare Masse
A: Molybdopterin oxidoreductase	YP_001528081.1	Dole_0194	114 kDa
B: 4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain-containing protein	YP_001528083.1	Dole_0196	45 kDa
C: gamma-subunit of ethylbenzene dehydrogenase	YP_001528082.1	Dole_0195	25 kDa

5.2 *In silico* Analyse des Ethylbenzol Dehydrogenase-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans* und Vergleich mit anderen Molybdänenzymen.

Ein Gencluster der für ein EbDH-ähnliches Molybdänenzym kodiert, konnte im Genom von *D. oleovorans* identifiziert werden (NCBI Referenzsequenz: NC_009943.1). Die drei Gene die für die Untereinheiten kodieren sind dabei in der Reihenfolge α - γ - β angeordnet, zusammen mit einem weiteren Gen welches für ein Chaperon (TorD-ähnlich) kodiert (δ -Untereinheit). Eine BlastP Analyse der Aminosäuresequenzen (Stand 22.11.12) der Untereinheiten ergab, dass diese eine hohe Sequenzähnlichkeit bzw. Sequenzidentität zu den Untereinheiten der Ethylbenzol Dehydrogenase (EbDH) aus *A. aromaticum* EbN1, dem entsprechenden Isoenzym EbDH2 sowie der EbDH aus *Azoarcus* sp. EB-1 aufweisen, gefolgt von weiteren Enzymen aus der Steroid C25 Dehydrogenase Familie. Zur Einordnung des EbDH-ähnlichen Enzyms in die Familie der Molybdänenzyme wurden ein multiples Sequenzalignment der Aminosäuresequenz der α -Untereinheiten (ohne Signalpeptid) von 60 Molybdänenzymen der DMSO Reduktase Familie (Subtypen I – III) mit ClustalW durchgeführt. Mit dem erhaltenen Alignment wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt der die einzelnen Vertreter der Subtypen zu Clustern anordnet welche die verschiedenen Enzymuntereinheiten zu Gruppen mit hoher Sequenzidentität und/oder gemeinsamer Funktion zusammenfassen (Abb. 18). Die β - und γ -Untereinheiten wurden dabei nicht berücksichtigt, da diese in allen Molybdänenzymen der DMSO Reduktase Familie die gleiche Funktion aufweisen (Elektronentransport) bzw. in manchen Vertretern der Enzymfamilie nicht vorhanden sind. Der phylogenetische Baum zeigt, dass die Ethylbenzol Dehydrogenasen aus EbN1 und EB-1 einen Cluster mit den putativen Ethylbenzol Dehydrogenasen (EbDH-ähnliches Enzym von *D. oleovorans* und *S. denitrificans* sowie EbDH2 aus EbN1) bilden

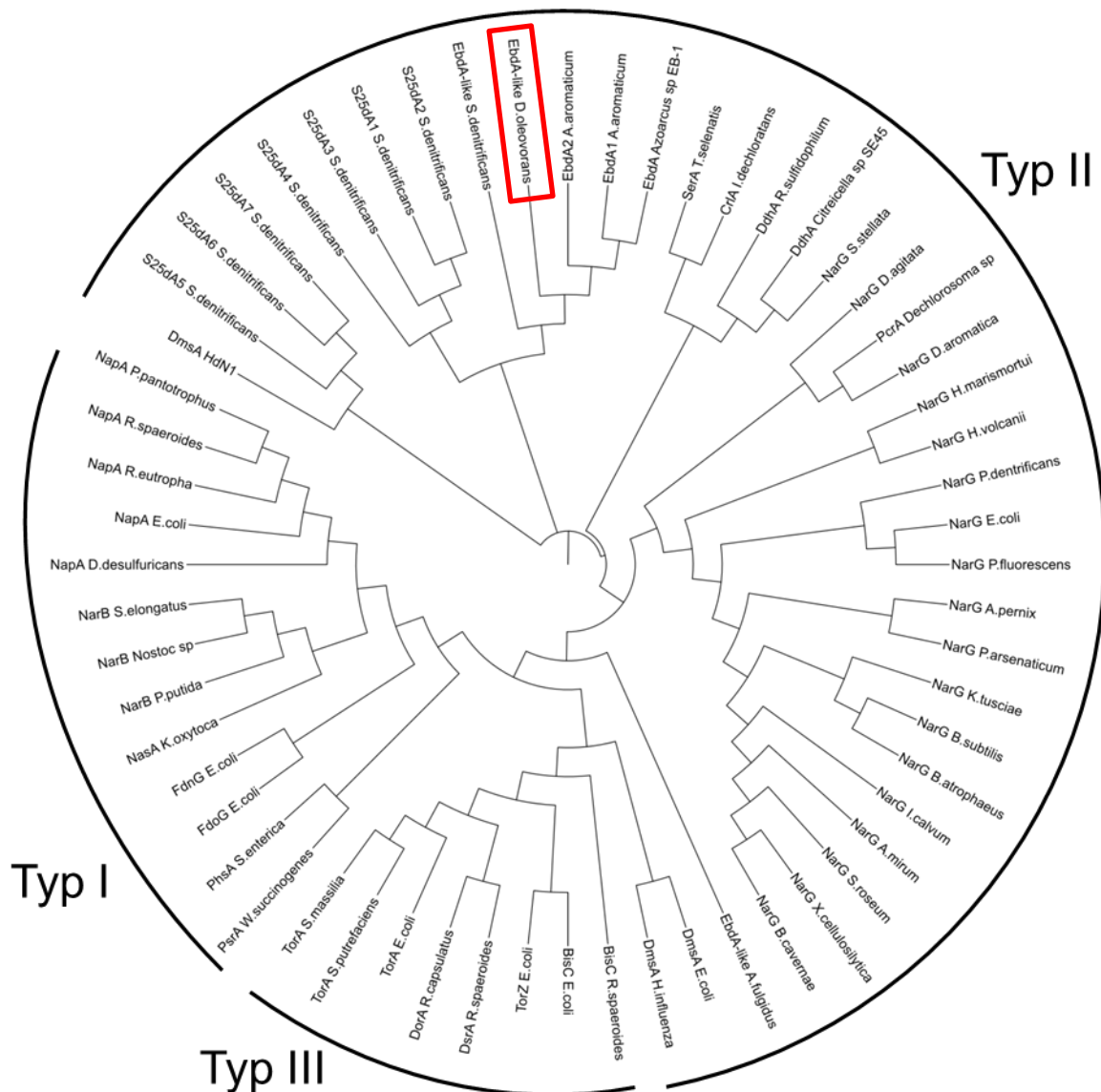


Abb. 18: Phylogenetischer Stammbaum der α -Untereinheiten von 60 Molybdänenzymen aus der DMSO Reduktase Familie. Die Eingruppierung in die drei Subtypen ist eingezeichnet. Die α -Untereinheiten des EbdH-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans* ist durch einen roten Rahmen gekennzeichnet. Der Baum wurde mit iTOL (interactive Tree of Life; itol.embl.de) erstellt. Die einzelnen Aminosäuresequenzen wurden aus NCBI Datenbankeinträgen entnommen.

(Abb. 18 Mitte oben). Dieser Cluster bildet mit einem weiteren Cluster aus bekannten sowie putativen Steroid C25 Dehydrogenasen aus *S. denitrificans* einen Supercluster von Molybdänenzymen deren Gemeinsamkeit die Aktivierung bzw. die Hydroxylierung von unsubstituierten Kohlenwasserstoffsubstraten zu sein scheint (Abb. 18 Mitte links oben). Dies steht im Gegensatz zur Funktion vieler anderer Mitglieder der DMSO Reduktase Familie die vorwiegend die Funktion einer terminalen Reduktase einer anaeroben Atmungskette aufweisen (DMSO Reduktase, Nitratreduktase, Chloratreduktase, Perchloratreduktase, Selenatreduktase etc.). Mit den Aminosäuresequenzen der α -Untereinheiten von 22 Molybdänenzymen des Subtyps II der DMSO Reduktase Familie

(inklusive des EbDH-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans* und der EbDH aus EbN1) wurde eine weiteres ClustalW Alignment durchgeführt um die Aminosäuresequenzen die im Bereich des aktiven Zentrums der EbDH liegen, näher zu betrachten (Abb. 19). Dabei fällt zuerst auf, dass alle untersuchten Vertreter das konservierte Aspartat aufweisen, welches typisch für die Ethylbenzol Dehydrogenase und die dissimilatorische Nitratreduktase von *E. coli* ist und welches direkt das Molybdänatom bindet. Interessanter für eine Vorhersage der Funktion der Enzyme ist jedoch das Histidin192 der Ethylbenzol Dehydrogenase welches aufgrund des Computermodells für die katalytische Funktion wichtig ist (Kloer et al., 2006; Szaleniec et al., 2010). Dieses Histidin scheint in der EbDH2 aus EbN1 vorhanden zu sein, nicht jedoch im EbDH-ähnlichen Enzym aus *D. oleovorans*. Hier steht ein Prolin an der Stelle des Histidins. Interessanterweise besitzt die große Untereinheit der Steroid C25 Dehydrogenase (S25dA1) an dieser Stelle ebenfalls kein Histidin, sondern ein Threonin, genauso wie S25dA2 und -A4 sowie das EbDH-ähnliche Enzym aus *S. denitrificans*. Insgesamt besitzt außer der EbDH und EbDH2 aus EbN1 keine weitere Untereinheit der untersuchten Enzyme das entsprechende Histidin. Stattdessen findet sich dort vorwiegend eine apolare Aminosäure wie Glycin, Prolin, Isoleucin oder Valin.

```

EbdA1 A. aromaticum      WDEAAGDIADSIIDSFEAQSGDGFILDAIVHAGSIAWGA---GFRMTYLMGDGVSPDINVDIGTY 192
EbdA2 A. aromaticum      WDEATADIADAIIDGIEGTEGDSFILDSPVHAGSVANS---GYRMTYLLDGVSPDNNVDIGTY 181
EbdA-like D. oleovorans  WDQCLAEIAEGIVDGLAEQGPESIIFFESGNGGGYVHVMA---VHRLMVS LGATVLDLDSTIGFN 183
EbdA-like S. denitrificans WDEALADIADRMIDVMRTDGPAGITWDPGANAGGGASTA---PYRLGFILDTPMIDVNTVEVGH 201
S25dA1 S. denitrificans  WDEALTEIADKLIDAAVAEGTESIIFDDGTNAGYGPETAG--DVRFATSLQTTKIDSWAGVSGMP 191
S25dA2 S. denitrificans  WDEALTEIADKLIDAAVAEGTESIIFDDGTNAGYGPETAG--DWRFADAIQATKIDSWAGVSGMP 191
S25dA3 S. denitrificans  WDEALNEIADKLIDISVEHGTETICFDD--SNTGYGPETAG--DFRFSTALQVTRLGDWVGSGMP 190
S25dA4 S. denitrificans  WDEALNEICDKLIDVAIDQGTESIIFDDGTNAGYGPETAG--DVRFTEALNCTQMDSWAGVSGMP 193
S25dA6 S. denitrificans  WEQALREIAVKTVDAAEKWGTDTIYQDLAPNFDGPGSTAG--RKFQFQFAGGIFADNWAEIGLN 207
S25dA7 S. denitrificans  WEQALREIAVKTVDAAEKWGTDTIYQDLAPNFDGPGSTAG--RKFQFQFAGGIFADNWAEIGLN 206
S25dA5 S. denitrificans  WEQALREIAVKTVDAAVEEYGTDTVFQDLAPNFDGPGSTAG--RKFQFQFAGGIFADNWAEIGLN 196
DmsA Stamm HdN1         WDQALGEIAEKIVDISEKYGTDTYIHDMPHHDGFGPTTAA--RARFFSMLGASLADNWAEIGLN 182
SerA T. selenatis        WDEAFTEIADKIIDTTVKRGPGNVCMKPKR---FAVITSAG---YSRLANLIGAIPDVSSMTGGLY 185
CrlA I. dechloratans     WDEALTEIADKIIDTTVKRGPGNIYIPKR---FAVITNTA---YTRMTKLLGAISPDATSMTGGLY 185
DdhA R. sulfidophilum    WDQATEEIIADKIIDIEKYGPGLMTHGTGNGMSMMRMAA---PYRFASLVGGVQLDIFTDVGGLN 189
NarG A. pernix           WDTVLEIIASALVYTIKKYGPDRIFGFTTPAMSPVSYAS---GARFIELIGGSMGSFYDWYALP 229
NarG P. arsenaticum      WDEALELVSAAIIYTIKKYGPDRIFGFTTPAMSPVSYAA---GARFIELIGGVMGSFYDWYALP 229
NarG E. coli              WQEVNELIAASNVYTIKNYGPDRVAGFSPPAMSMVSYAS---GARYLSLIGGTCLSFYDWYALP 216
NarG H. marismortui      WDEALTEIADHVIDEVQAGRYDAISGFTTPAMSPVSYAS---GSRLVNLGGVSHSFYDWYALP 191
PcrA Dechlorosoma sp.    WEEALDMIADKCVDTIKNHAPDCISVYSPPAVSPVFSFA---GHRFAHYIGAHAHTFCDWYGH 182
EbdA-like A. fulgidus    WDEALDYVADRLADIMKRHPESVAISIQPGTGYVHKGA---MMRLASMFQWSALHGTYMNGLP 174
DmsA E. coli             WEEAYDIIATNMQRILKEYGNESIYLYNGSGTLGGTMTRSWPPGNTLVARLMNCCGGYLNHYGYS 175

```

Abb. 19: Alignment der Aminosäuresequenzen von α -Untereinheiten ausgewählter Mitglieder des Subtyps II der DMSO Reduktase Familie. Aminosäuren von besonderer Bedeutung sind rot hinterlegt.

5.3 Klonierung der Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans*

Zur biochemischen Charakterisierung des EbDH-ähnlichen Enzyms muss dieses heterolog in einem anderen Organismus produziert werden, da mit *D. oleovorans* aufgrund des langsamen Wachstums und der niedrigen Zelldichten nicht genügend Proteinmenge erhalten werden kann. Aus diesem Grund wurden die Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms zusammen mit dem Gen für das Chaperon in einen Expressionsvektor für *E. coli* kloniert (Abb. 20). Die

Klonierung erfolgte mit dem StarGate-System von IBA (siehe Material und Methoden). Dabei wurde mittels PCR separat das Gen der α -Untereinheit und als gemeinsames Fragment die Gene der $\gamma\beta\delta$ -Untereinheiten amplifiziert, in pEntry Donorvektoren kloniert und zur Kontrolle sequenziert (siehe Material und Methoden). Anschließend wurde das Gen der α -Untereinheit in einen pNFUSE Vektor und das gemeinsame Genfragment der $\gamma\beta\delta$ -Untereinheiten in einen pCFUSE Vektor kloniert. Die Fusion der beiden Fragmente und Klonierung in einen pEntry Donorvektor erfolgte mittels *Fusion Cloning* (siehe Material und Methoden). Die Klonierung erfolgte dabei so, dass im erhaltenen Vektor das $\gamma\beta\delta$ -Fragment am 5'-Ende und das α -Fragment am 3'-Ende liegt. Im letzten Schritt wurde das $\gamma\beta\delta\alpha$ -Fragment in den *E. coli* Expressionsvektor pASG-IBA3 kloniert. Da das Gen der α -Untereinheit eine interne Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Lgl* enthält und dies zu Problemen bei der Klonierung des Gens vom pCFUSE Vektor in den pEntry Vektor führte, wurde bei der Klonierung zugleich die Sequenz der internen *Lgl* Restriktionsschnittstelle durch eine stille Mutation mutiert (AGC Codon \rightarrow AGT Codon). Anschließend konnte die Klonierung in den pEntry Vektor problemlos erfolgen.

Ein erster Überexpressions-Versuch mit den Plasmiden pASG-IBA3_EbDH-like erfolgte in den *E. coli* Stämmen DH5 α , JM109 und FM420. Dabei wurde gezeigt, dass nach Induktion der Kulturen mit AHT Proteinbanden mit den apparenten Molekularmassen der β - und γ -Untereinheiten gebildet wurden, allerdings kein Protein in der Größe der erwarteten α -Untereinheit. (Daten nicht gezeigt).

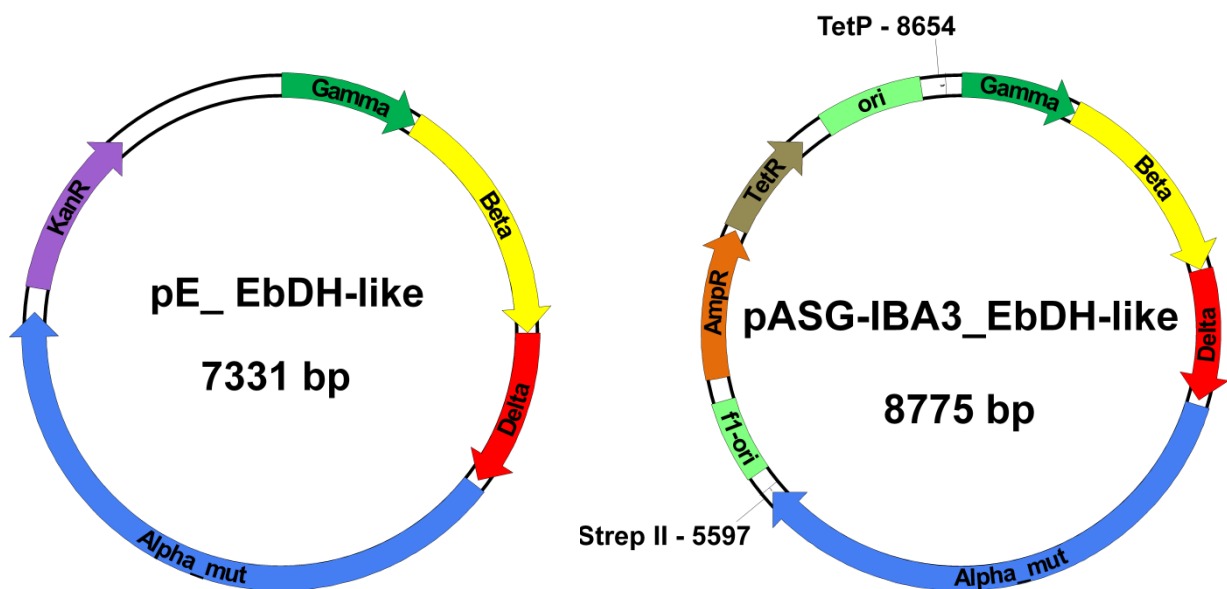


Abb. 20: Vektorkarten der Vektoren in die die Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans* kloniert wurden. Links: Donorvektor pEntry; Rechts: *E. coli* Expressionsvektor pASG-IBA3. KanR=Kanamycinresistenzgen; TetR=Tetrazyklinrepressorgen; AmpR=Ampicillinresistenzgen; TetP=Tetrazyklinpromotor; Ori=Replikationsursprung; f1-ori: Replikationsursprung des Phagen f1.

Diskussion

1. Mechanismus und Funktion der Ethylbenzol Dehydrogenase

Der initiale Schritt des anaeroben Ethylbenzolabbaus in dem denitrifizierenden Betaproteobakterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1 ist die Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol. Diese sauerstoffunabhängige und stereospezifische Reaktion wird katalysiert durch die Ethylbenzol Dehydrogenase (EbDH), ein Molybdänenzym aus der DMSO Reduktase Familie. EbDH wurde in den vergangenen Jahren biochemisch charakterisiert und die dreidimensionale Struktur aufgeklärt (Kniemeyer und Heider, 2001; Johnson et al., 2001; Kloer et al., 2006; Szaleniec et al., 2007). Mit Hilfe dieser Daten und chemoinformatischen Berechnungen (Szaleniec et al., 2006; Szaleniec et al., 2008; Szaleniec et al., 2010; Szaleniec et al., 2012) wurde ein Reaktionsmechanismus für das Enzym vorgeschlagen. Demnach verläuft die Hydroxylierung von Ethylbenzol über ein konsekutives Radikal- und Carbokation-Intermediat.

In der vorliegenden Dissertation wurden weitere Untersuchungen zur Unterstützung dieser Hypothese und zur generellen Aufklärung des Mechanismus bzw. der Funktion der Ethylbenzol Dehydrogenase durchgeführt. Der Schwerpunkt lag dabei auf Untersuchungen zur Kinetik von alternativen Substraten und Inhibitoren und der Bestimmung derer kinetischen Parameter. In den beiden Publikationen die den Hauptteil dieser Dissertation bilden, wurden die erhaltenen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Die wichtigsten Erkenntnisse sollen hier kurz erläutert und diskutiert werden: i.) Propylsubstituierte Substrate werden schlechter umgesetzt als ihre ethylsubstituierten Gegenstücke. Dies korreliert zu einer höheren benötigten Aktivierungsenergie dieser Substrate und kann zusätzlich auf sterische Gründe zurückgeführt werden. ii.) Substrate mit ungesättigten Bindungen, die an das zu hydroxylierende C1 Atom des Substituenten angrenzen, werden besser umgesetzt, weil sie ein putatives Radikal-Intermediat stabilisieren. Substrate mit ungesättigten Bindungen die die C1 Atome von Alkylsubstituenten mit einschließen, können dagegen nicht hydroxyliert werden, da die Aktivierungsenergie zur Bildung des putativen Radikal-Intermediats zu hoch ist. iii.) Zusätzliche Substituenten am benzylichen Ring von alkylierten Substraten beeinflussen die Umsatzrate, indem sie die putativen Radikal- und/oder Carbokation-Intermediate entweder stabilisieren oder destabilisieren. iv.) Bicyklische Aromaten wie Indan werden gut umgesetzt, weil die Seitenkette planar mit dem aromatischen Ring liegt und damit offenbar die Orientierung des putativen Radikal-Intermediats im Aktiven Zentrum nachahmt. v.) Methyl-substituierte Verbindungen können nicht hydroxyliert werden, da die Aktivierungsenergie der primären C1-Atome zur Bildung des putativen Radikal-Intermediats offenbar zu hoch ist. vi.) Bestimmte Substituenten am aromatischen Ring oder Heteroatome innerhalb heterozyklischer Verbindungen verhindern

die Bildung eines stabilen Radikal- oder Carbokation-Intermediats und verhindern somit die Hydroxylierungsreaktion. Dies kann entweder auf sterische Hinderung oder elektronische Einflüsse zurückgeführt werden vii.) Die isosterischen und isoelektronischen Ethylbenzolderivate *N*-Ethyl-1,2-Azaborin und *B*-Ethyl-1,2-Azaborin werden im Gegensatz zu Ethylbenzol nicht umgesetzt sondern sind aufgrund der hohen benötigten Aktivierungsenergie für die Bildung des Carbokation-Intermediats unreaktiv und damit Inhibitoren der Ethylbenzol Dehydrogenase. Ausschlaggebend für die potente inhibitorische Wirkung ist dabei die Kombination der Effekte aus geometrischer Ähnlichkeit und Unterschieden in der elektronischen Struktur die durch die BN/CC Isosterie verursacht werden und nicht die Substitution am Heteroatom. Dies wurde verifiziert durch die Identifizierung von *N*-Ethylpyrrol als Substrat der EbDH. Des Weiteren wird auch *N*-Ethylpyrrolidin von der EbDH umgesetzt. Dies ist von besonderer Bedeutung da dies das erste nicht-aromatische Substrat der EbDH wäre (Daten nicht gezeigt; ein Produktnachweis mittels LC-MS oder GC-MS steht noch aus).

Das spezifische Verhalten bzw. die Kinetik der beschriebenen Substrate und Inhibitoren sowie die Natur der Hydroxylierungsprodukte der Substrate geben einen starken Hinweis auf die Existenz der vermuteten Radikal- und Carbokation-Intermediate. Dadurch stützen diese experimentellen Daten die theoretischen Daten die durch DFT Modeling und QM:MM Modeling erhalten wurden (Szaleniec et al. 2006; Szaleniec et al. 2008; Szaleniec et al., 2010; Szaleniec et al., 2012). Demnach ist eine Oxidation von Ethylbenzol in zwei Stufen über ein Radikal- und ein Carbokation-Intermediat energetisch günstiger als die einstufige Oxidation von Ethylbenzol direkt zum Carbokation-Intermediat. Aus diesen Gründen kann postuliert werden, dass die Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffsubstraten durch die Ethylbenzol Dehydrogenase sehr wahrscheinlich in zwei Schritten über ein Radikal-Intermediat und ein Carbokation-Intermediat verläuft (siehe Abb. 21).

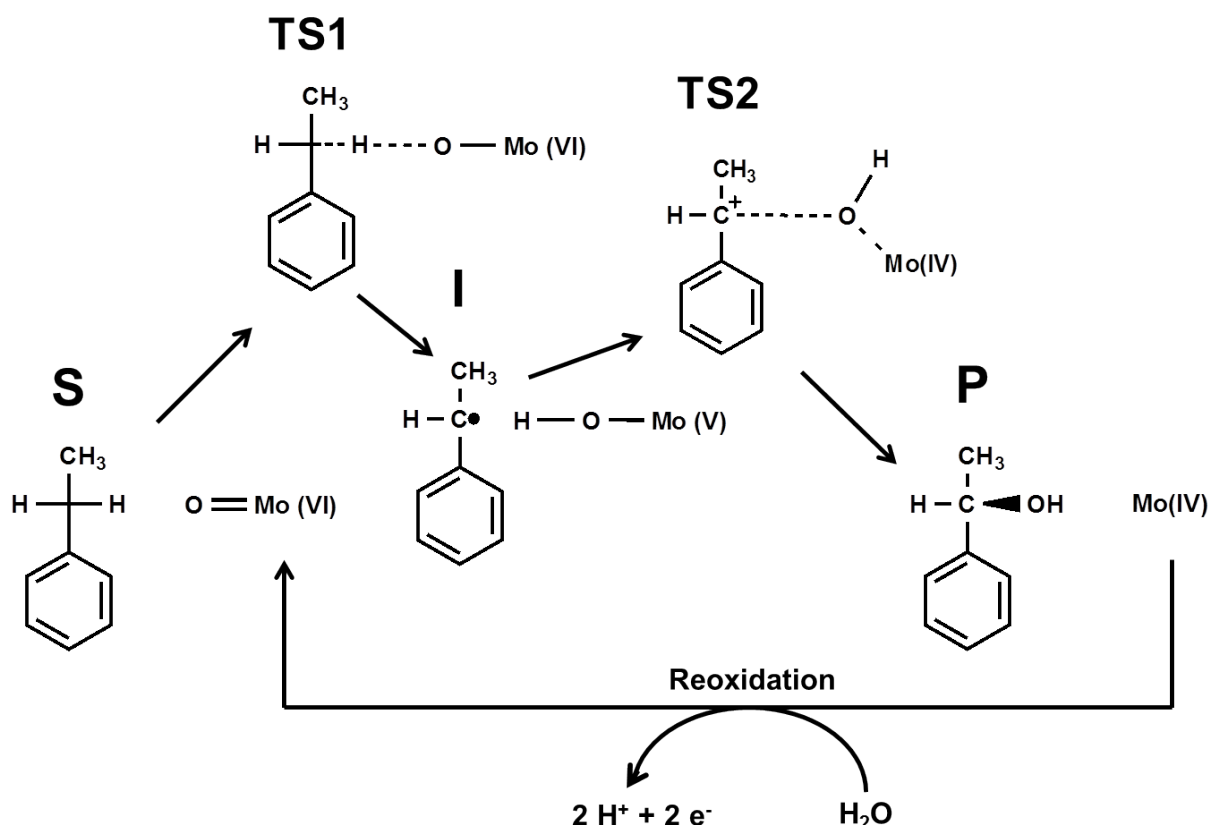


Abb. 21: Postulierter Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase. S: Substrat (Ethylbenzol); TS1: Transition state 1: Annäherung des *pro*(S) Wasserstoffatoms vom C1 Atom des Ethylsubstituenten zum Oxo-Liganden am Molybdänatom; I: (Radikal) intermediate state: Bildung des Radikal-Intermediats durch die Abspaltung des *pro*(S) Protons und eines Elektrons vom C1 Atom des Ethylsubstituenten durch den Oxo-Liganden am Molybdänatom und Bildung einer Hydroxylgruppe. TS2: Transition state 2: Nukleophiler Angriff der Hydroxylgruppe am C1 Atom des Ethylsubstituenten und gleichzeitiger Transfer eines weiteren Elektrons vom Radikal-Intermediat zum Molybdänatom. P: Produkt (S)-1-Phenylethanol; Reoxidation des Molybdänatoms (Oxidationsstufe IV zu VI) durch Bindung von Wasser. Die vertikale Position der Reaktanden stellt schematisch deren Energiezustände dar. Das radikal-ähnliche Intermediat in TS1 besitzt dabei die höchste Energie. Die Aktivierung des Substrats zu diesem Intermediat ist demnach der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion.

Da die Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol höchst stereospezifisch verläuft (Johnson und Spormann, 1999; Kniemeyer und Heider, 2001), wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Szaleniec in Krakau die Stereochemie der Alkoholprodukte von 28 EbDH Substraten untersucht (unveröffentlicht). Die Ergebnisse zeigen für 18 Substrate eine sehr hohe Stereoselektivität (Enantiomerenüberschuss von 100% im Rahmen der Nachweisgrenze) und für die restlichen Substrate eine geringere Stereoselektivität (Enantiomerenüberschuss von 10 bis 95%) für den gebildeten S-Alkohol. Eine Erklärung für die unterschiedliche Stereospezifität konnte mit Hilfe von DFT-Modeling

und QM:MM Modeling gefunden werden. Demnach wird die Stereospezifität der Hydroxylierung primär durch die Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum der EbDH bestimmt. Den Berechnungen zufolge ist die Orientierung des Substratmoleküls mit dem *pro(S)* Wasserstoffatom des C1 Atoms des Ethylsubstituenten in Richtung des Molybdänatoms energetisch günstiger für die Aktivierung des Substrats zum Radikal-Intermediat als die Orientierung mit dem *pro(R)* Wasserstoffatom in Richtung des Molybdänatoms. Dies ist auf sterische Interaktionen innerhalb des aktiven Zentrums zurückzuführen, wonach der Abstand des Ethylsubstituenten in *pro(S)* Orientierung zu den benachbarten Aminosäuren Asn218 und Ile221 länger ist (ca. 5 Å) als bei der *pro(R)* Orientierung (ca. 3 Å; siehe Abb. 22). Aufgrund der energetischen Unterschiede soll die Hydroxylierung von Substraten in *pro(S)* Orientierung ca. 500-mal schneller sein als in *pro(R)* Orientierung (Berechnungen von Dr. Maciej Szaleniec, unveröffentlicht). Dies erklärt jedoch nicht die geringere Stereoselektivität mancher EbDH Substrate. Aus diesem Grund wurden drei mögliche Szenarien entworfen und mit einer Kombination von DFT und QM:MM Modeling berechnet, aus denen der Verlust der Stereoselektivität resultieren könnte: I.) Es wurde beobachtet, dass der Enantiomerenüberschuss für den (S)-Alkohol desto niedriger ist, je besser das Carbokation-Intermediat stabilisiert ist. Daraus kann man ableiten, dass solche stabilisierten Carbokation-Intermediate eventuell im aktiven Zentrum um 180° rotieren können, was zur Hydroxylierung entweder in (R) oder (S) Position führt. II.) Die Carbokation-

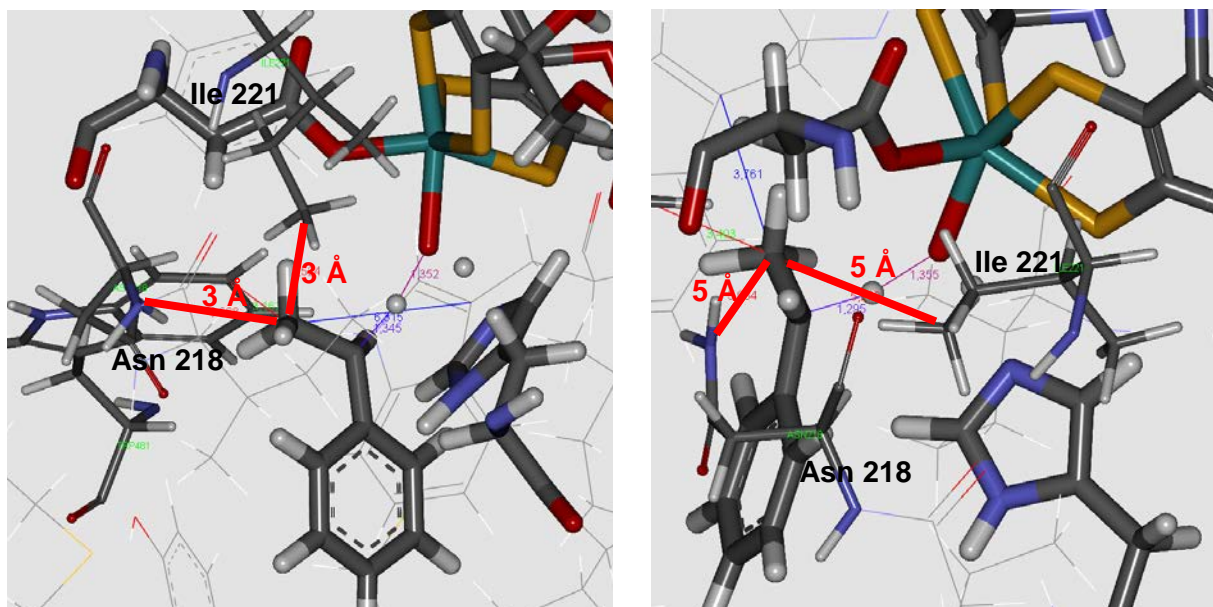


Abb. 22: Strukturansicht von Ethylbenzol im aktiven Zentrum der EbDH. Ethylbenzol befindet sich dabei im Übergangszustand TS1 und nähert sich einmal in *pro(S)* (links) und einmal in *pro(R)* (rechts) Orientierung dem Oxo-Liganden am Molybdänatom. Für Details, siehe Text. Die Abbildung wurde mit Discovery Studio 3.1 erstellt.

Intermediate von *para*-hydroxy- oder *para*-aminosubstituierten Substraten wie 4-Ethylphenol und 4-Ethylanilin könnten in einem alternativen Reaktionsweg von einer günstig gelegenen Aminosäure (Asp485) deprotoniert werden woraufhin sie zu einem Chinon-Ethid- oder Imin-Ethid-Intermediat umlagern, welches mit Wasser zu beiden Enantiomeren des Alkohols umgesetzt werden kann. III.) Sterische Interaktionen zwischen benachbarten Substituenten können die Bindung des Substrats bzw. dessen Position im aktiven Zentrum beeinflussen, wodurch die Hydroxylierungsreaktion auch vermehrt an der (*R*)-Position erfolgen kann (1,2-Diethylbenzol).

Zur Unterstützung der theoretischen Daten der Stereospezifität der Hydroxylierungsreaktion erfolgten in dieser Arbeit enzymkinetische Untersuchungen mit spezifisch am C1 Atom deuterierten Ethylbenzolderivaten. Die gemessene Enzymaktivität des Ethylbenzols mit der Deuterierung in *pro*(*S*) Orientierung betrug dabei etwa 68% der Enzymaktivität des Ethylbenzols mit der Deuterierung in *pro*(*R*) Orientierung (kinetischer Isotopeneffekt ca. 3,2). Dieser Unterschied in der Enzymaktivität zwischen den beiden Enantiomeren fällt wegen der relativ geringen Enantiomerenreinheit der selbst synthetisierten Substrate geringer aus als erwartet. Eine mögliche Erklärung für die geringe Enantiomerenreinheit der synthetisierten Isomere wäre eine teilweise Racemisierung der Reaktanden bzw. Produkte während des zweiten Schritts der Synthese (Holland et al., 1988). Nach den Ergebnissen der VCD-Spektroskopie Analyse beider Syntheseprodukte beträgt der Enantiomerenanteil für eines der beiden Enantiomere ca. 55-60% im jeweiligen Stoffgemisch. Die MS Analyse der enzymatischen Produkte ergab einen Enantiomerenanteil von 54% für das (*R*)-Enantiomer und 66% für das (*S*)-Enantiomer im jeweiligen Stoffgemisch. Die gemessenen kinetischen Isotopeneffekte betrugen 3,2 für das (*S*)-Enantiomer, 2,1 für das (*R*)-Enantiomer und 27 für komplett deuteriertes [$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol. Dabei erscheint der kinetische Isotopeneffekt von [$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol zu hoch, wenn man bedenkt das maximale kinetische Isotopeneffekte von deuterierten Substanzen in der Regel maximal Werte von ca. 10 annehmen können. Diese Abweichung lässt sich durch die geringe absolute Enzymaktivität von [$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol und dem dadurch resultierenden Messfehler erklären (siehe Enzymaktivität von [$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol und Standardabweichung im Ergebnisteil). In einer früheren Arbeit (Szaleniec et al., 2010) wurde der KIE von [$^2\text{H}_{10}$]-Ethylbenzol mit der EbDH beim gleichen pH Wert wie in dieser Arbeit (pH=7,5) mit 7 bestimmt. Kinetische Isotopeneffekte lassen sich genauer in einen primären und sekundären kinetischen Isotopeneffekt einteilen. Bei der Verwendung von deuterierten Substanzen tritt der primäre KIE auf wenn ein Deuteriumatom direkt abgespalten wird. Er kann dabei maximal eine Größe von etwa 10 annehmen. Der sekundäre KIE mit deuterierten Substanzen tritt auf wenn sich ein Deuteriumatom in unmittelbarer Nähe eines Atoms befindet welches abgespalten wird. Dies hat nur einen kleinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Somit kann der sekundäre KIE nur Größen von

maximal 1,5 annehmen. Werden den deuterierten Ethylbenzolenantiomeren nun die primären und sekundären KIE Werte zugewiesen, die mit der EbDH zu erwarten sind, so ergibt sich folgendes Bild: Bei der Verwendung des (*R*)-Enantiomers wird ein sekundärer KIE erwartet ($KIE=1,5$; entspricht ca. 67% Enzymaktivität in Relation zu Ethylbenzol) da lediglich das in der Nähe des Deuteriumatoms befindliche Wasserstoffatom abgespalten wird. Bei der Verwendung des (*S*)-Enantiomers wird dagegen ein primärer KIE erwartet ($KIE=7$; ca. 14% Enzymaktivität) weil das Deuteriumatom direkt abgespalten wird. Durch den jeweiligen Anteil der beiden Enantiomere in den Stoffgemischen und den zu erwarteten Enzymaktivitäten ergibt sich eine kombinierte, theoretische Enzymaktivität: Für das Gemisch mit dem (*R*)-Enantiomer im Überschuss beträgt diese Aktivität ca. 43% (siehe Tabelle 9). Das entspricht einem KIE von 2,3. Für das Gemisch mit dem (*S*)-Enantiomer im Überschuss beträgt diese Aktivität ca. 32 % welches einem KIE von 3,1 entspricht. Beide theoretischen Werte liegen sehr nahe an den experimentell bestimmten Werten, was darauf schließen lässt, dass die Enantiomerenreinheit der synthetisierten Derivate korrekt bestimmt wurde und die Annahmen für die zu erwartenden Werte des primären und sekundären KIE richtig zu sein scheinen.

Zusammenfassend ergeben sich somit sehr starke Hinweise, dass die EbDH im ersten Schritt der enzymatischen Reaktion tatsächlich das *pro(S)* Wasserstoffatom vom C1 Atom des Ethylsubstituenten von Ethylbenzol abspaltet und die theoretischen Berechnungen korrekt sind. Ein endgültiger Beweis könnte erfolgen, indem die kinetischen Isotopeneffekte mit den reinen (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren der deuterierten Ethylbenzole bestimmt werden.

Tab. 9: Vergleich von theoretischen und experimentell bestimmten Enzymaktivitäten bzw. kinetischen Isotopeneffekten der deuterierten Ethylbenzole.

Substrat (und % Anteile der Enantiomere)	Aktivität (%) (theor.)	Aktivität (%) (exp.)	KIE (theor.)	KIE (exp.)
Ethylbenzol	100	100	1	1
[² H ₁₀]-Ethylbenzol	14	14	7	7
(<i>S</i>)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol (<i>S</i> =66%; <i>R</i> =34%)	(0,66 x 14) + (0,34 x 67) = 32	32	3,1	3,2
(<i>R</i>)-[1- ² H ₁]-Ethylbenzol (<i>R</i> =54%; <i>S</i> =46%)	(0,54 x 67) + (0,46 x 14) = 43	47	2,3	2,1

Die theoretisch ermittelten Werte wurden unter folgenden Annahmen berechnet: Ein primärer KIE bedeutet eine Verringerung der Aktivität auf ca. 14% ($KIE=7$), ein sekundärer KIE bedeutet eine Verringerung der Aktivität auf ca. 67 % ($KIE=1,5$). Für mehr Details siehe Text.

Ein weiterer Aspekt der Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase war die Verifizierung einer vermuteten Hydratisierungsaktivität für ungesättigte C-C-Bindungen (Johnson et al., 2001; Szaleniec et al., 2007). Dazu wurden 11 aromatische bzw. aliphatische Alkensubstrate auf die Bildung eines korrespondierenden Alkoholprodukts durch Wasseranlagerung hin untersucht. Dabei konnten keine Alkoholprodukte festgestellt werden. Damit bleibt das einzig bekannte Enzym welches die Anlagerung von Wasser an eine ungesättigte Bindung zu katalysieren vermag die Acetylenhydratase (Rosner und Schink, 1995; Rosner et al., 1997; Meckenstock et al., 1999). Dieses Wolframenzym aus der DMSO Reduktase Familie besitzt eine strukturelle Ähnlichkeit zur α -Untereinheit der EbDH. Außerdem sollte der Wolframcofaktor der Acetylenhydratase eine ähnliche katalytische Aktivität besitzen wie der Molybdäncofaktor der EbDH. Das katalytisch aktive Wolframatom liegt in der Acetylenhydratase jedoch ausschließlich im reduzierten Zustand vor (Oxidationsstufe +IV) (Seiffert et al., 2007) und wechselt nicht zwischen oxidierten und reduzierten Zuständen wie das Molybdänatom der EbDH (Oxidationsstufe +IV bis +VI) Auch nach Reduktion der EbDH und damit auch des Molybdänatoms durch Natriumdithionit konnte keine Hydratisierungsaktivität der EbDH erzeugt werden.

Neben den Untersuchungen zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der stereoselektiven Hydroxylierung von Ethylbenzol (1. Teilreaktion) wurden auch Untersuchungen zur Kinetik des kompletten Reaktionsablaufs inklusive der Reduktion des zweiten Substrats (=Elektronenakzeptor; 2. Teilreaktion) durchgeführt. Dadurch sollte das kinetische Modell der EbDH bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden enzymatische Tests mit den alternativen EbDH Substraten 3-Phenyl-1-propen (Allylbenzol) und 3-Phenyl-1-Propin und den artifiziellen Elektronenakzeptoren Ferriceniumtetrafluoroborat und Kaliumferricyanid durchgeführt. Mit diesen Daten und dem mathematischen Modell für einen Ping Pong Mechanismus wurden die enzymkinetischen Parameter berechnet und damit lineare Regressionsgeraden simuliert die parallel zueinander verlaufen. Die doppelt reziproke Auftragung der Enzymaktivitäten in dasselbe Koordinatensystem zeigt dass die Datenpunkte genau auf den linearen Regressionsgeradenliegen. Dies deutet darauf hin, dass die EbDH einem Ping-Pong Mechanismus folgt und keinem Ternärkomplex-Mechanismus (siehe Ergebnisse). Beim Ping-Pong Mechanismus binden und verlassen Substrate bzw. Produkte das Enzym unabhängig voneinander (sequenzieller Mechanismus; substituted enzyme mechanism) ganz im Gegensatz zum Ternärkomplex-Mechanismus, wo alle Substrate zusammen an das Enzym binden müssen um es anschließend als Produkte wieder zu verlassen (geordneter Mechanismus, ordered enzyme mechanism; Segel, 1975; Cornish-Bowden, 1995). Betrachtet man die Gesamtreaktion der von der EbDH katalysierten Reaktionen (Kohlenwasserstoffoxidation und Elektronenakzeptorreduktion) so wird deutlich,

dass der Ping-Pong Mechanismus zur Beschreibung des Reaktionsmodells der EbDH am geeignetsten erscheint: Es ist bekannt, dass sich die EbDH mittels Zugabe von Ethylbenzol reduzieren lässt (Kniemeyer und Heider, 2001). Dabei scheinen die Elektronen die von Ethylbenzol stammen in den Eisen-Schwefel-Clustern zwischengespeichert zu werden („Elektronenpool“, Prof. Heider, mündl. Mitteilung). Die Zwischenspeicherung der Elektronen innerhalb des Enzyms bedeutet, dass mehrere Substrate oxidiert werden können ohne dass ein Elektronenakzeptor reduziert werden muss. Die einzelnen Reaktionen sind demnach teilweise unabhängig voneinander. Eine Erklärung für die Unabhängigkeit der Teilreaktionen scheint dabei nicht nur der Elektronenpool zu sein sondern auch die unterschiedlichen Orte, an denen die Teilreaktionen stattfinden: Substratoxidation=Molybdäncofaktor der α -Untereinheit und Elektronenakzeptorreduktion=Häm der γ -Untereinheit. Für die Oxidation von monosubstituierten Substraten wie Ethylbenzol und die Reduktion von Ein-Elektronenüberträgern wie Ferricenium und Ferricyanid ergibt sich daraus für den Reaktionsmechanismus ein sogenannter Ping-Pong Hexa-Uni Mechanismus (siehe Abb. 23; Segel, 1975). Dabei treten theoretisch drei Substrate (Ethylbenzol, Elektronenakzeptor #1^{ox}, Elektronenakzeptor #2^{ox}) und drei Produkte ((S)-1-Phenylethanol, Elektronenakzeptor #1^{red}, Elektronenakzeptor #2^{red}) auf die unabhängig voneinander an das Enzym binden bzw. das Enzym verlassen. Da die beiden oxidierten und die beiden reduzierten Elektronenakzeptoren praktisch identisch sind, kann die Reaktionsgleichung des Ping-Pong Hexa-Uni Mechanismus zur Reaktionsgleichung für einen Ping Pong Bi Bi Mechanismus (Segel, 1975; Cornish-Bowden, 1995) vereinfacht werden. Für das Anpassen der kinetischen Daten mit LEONORA wurde daher letzteres Reaktionsmodell verwendet. Andere Mitglieder der DMSO Reduktase Enzymfamilie die ebenfalls einem Ping-Pong Mechanismus folgen sind z.B. die Formiatdehydrogenasen von *V. succinogenes* (Kröger et al., 1979) und *E. coli* (Axley et al., 1991) sowie die Nitratreduktase A von *E. coli* (Morpeth und Boxer, 1985; Giordani et al., 1997).

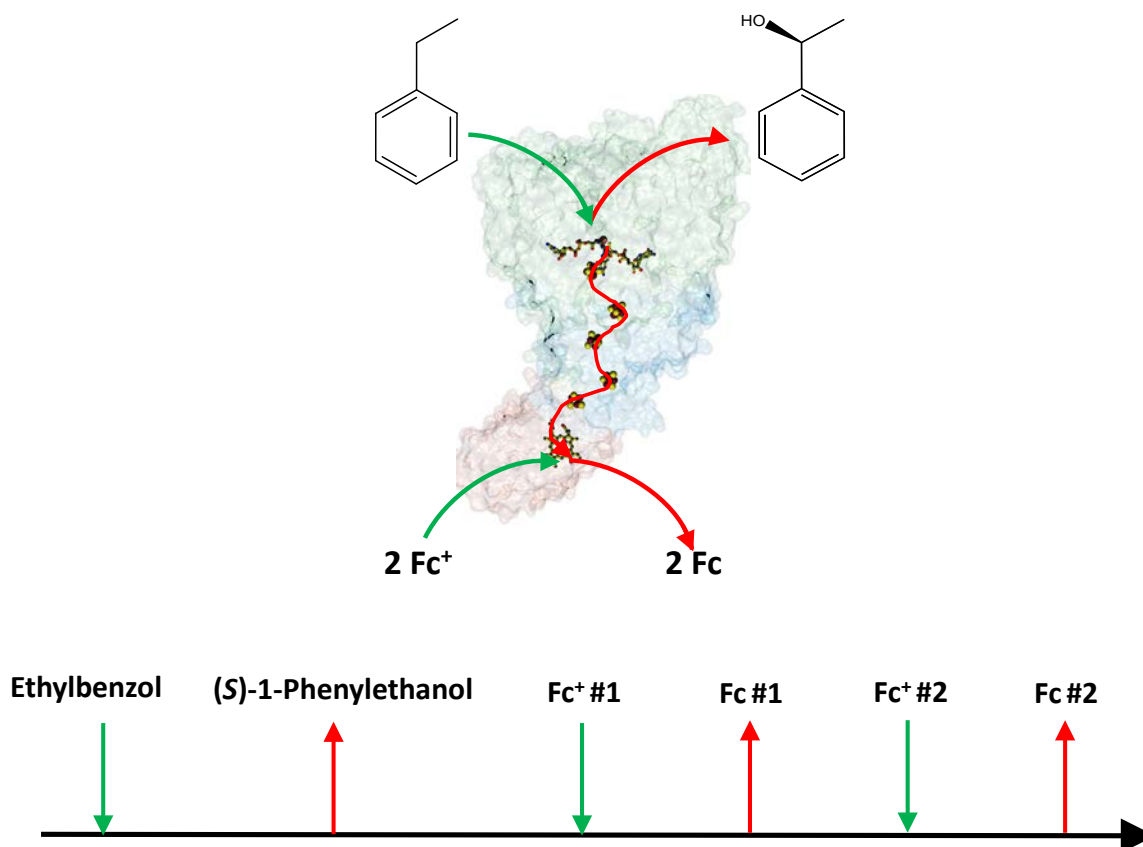


Abb. 23: Mögliches kinetisches Model der Ethylbenzol Dehydrogenase. Das Model zeigt einen sogenannten Ping-Pong Hexa-Uni Mechanismus: Dabei binden Substrate bzw. verlassen Produkte das Enzym unabhängig voneinander. Zunächst bindet Ethylbenzol und wird zu (S)-1-Phenylethanol oxidiert. Die zwei gewonnenen Elektronen werden über die Eisen-Schwefel-Cluster transportiert und es können zwei Ein-Elektronenüberträger (als Beispiel dient das Ferricenium-Kation) reduziert werden. Da angenommen wird, dass immer nur ein Ferricenium binden kann, muss das erste Ferricenium zuerst reduziert werden und das Enzym verlassen, bevor das nächste binden kann.

2. Anwendungspotential der Ethylbenzol Dehydrogenase

Das breite Substratspektrum und die hohe Stereoselektivität der Produktbildung machen die Ethylbenzol Dehydrogenase zu einem interessanten Kandidaten für die biotechnologische Herstellung von chiralen Alkoholen aus Kohlenwasserstoff-Vorläufermolekülen. Zur Verwendung von Enzymen in industriellen Prozessen müssen diese jedoch noch andere Kriterien erfüllen wie z.B. Enzymstabilität, hohe Produktausbeute, einfache Prozessführung etc. Aus diesem Grund wurden in dieser Dissertation Untersuchungen zum Anwendungspotential der EbDH durchgeführt. Ein kritischer Punkt bei der Etablierung eines biotechnologischen Prozesses ist die Löslichkeit bzw. Verfügbarkeit des Enzymsubstrats und des Produkts. Im Fall der EbDH ist insbesondere die Verfügbarkeit der Substrate aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit begrenzt. Die Konzentration dieser Stoffe ließe sich jedoch

durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln erhöhen. In dieser Arbeit wurden deshalb unterschiedliche Lösungsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen auf deren Einfluss auf die Enzymaktivität getestet. Dabei erwiesen sich nur *tert*-Butanol und PEG400 als geeignete Lösungsmittel. Die Zugabe der anderen organischen Lösungsmittel führte bereits in geringen Mengen zu einem signifikanten Verlust der Enzymaktivität. Eine Erklärung dafür könnte die denaturierende Wirkung dieser Lösungsmittel auf Proteine sein. *Tert*-Butanol und PEG400 scheinen jedoch Substanzen zu sein, die keinen denaturierenden Effekt sondern sogar einen schützenden Effekt auf Proteine besitzen. Dies zeigt insbesondere der positive Effekt von PEG400 auf die Enzymaktivität der EbDH. Dieses Polymer wird auch technisch zur Stabilisierung von Proteinen verwendet und scheint daher ideal als Additiv geeignet zu sein. Ein erster Versuch zur Erhöhung der Löslichkeit der Kohlenwasserstoffe durch Hinzugabe von PEG400 erfolgte in dieser Arbeit mit Ethylbenzol und Hinzugabe von 50 % PEG400. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Konzentration von Ethylbenzol in wässriger Lösung durch Zugabe von 50 % PEG400 um das 4-fache erhöhen lässt. Zum vollständigen Umsatz von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol muss die doppelte Menge an Ferriceniumtetrafluoroborat eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ferriceniumtetrafluoroborat bis zu einer Konzentration von 16 mM eingesetzt werden kann. Ein großer Nachteil von Ferriceniumtetrafluoroborat ist jedoch seine geringere Stabilität in wässrigen System mit neutralem pH-Wert, was den Einsatz dieses Elektronenakzeptors in einem technischen Prozess unwahrscheinlich erscheinen lässt. Daher wurde in dieser Arbeit Kaliumferricyanid als alternativer Elektronenakzeptor mit einem ähnlich hohen Redoxpotential getestet. Kaliumferricyanid zeigte eine ähnliche Enzymaktivität mit EbDH als Ferricenium und kann letzteres daher insbesondere in einem technischen Prozess ersetzen. Die Vorteile sind eine noch höhere Wasserlöslichkeit gegenüber Ferricenium sowie die höhere Stabilität in wässrigen Systemen mit neutralen pH-Wert. Dies erscheint ein kritischer Punkt für einen technischen Prozess zu sein, da die EbDH mit Ferricenium üblicherweise nach 3-4 Stunden stark an Aktivität einbüßt. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das Enzym nur aktiv bleibt, wenn es im oxidierten Zustand vorliegt (Kniemeyer und Heider, 2001). Dies ist vermutlich in Verbindung mit Ferricenium nach 3-4 Stunden Inkubationszeit nicht mehr gewährleistet. Kaliumferricyanid könnte daher, auch durch seine höher einsetzbare Menge, die Aktivität der EbDH für einen längeren Zeitraum sicherstellen indem es das Enzym in einem oxidierten Zustand hält und damit einen technischen Prozess rentabler machen.

Diese erzielten Ergebnisse können entscheidend zur Etablierung eines zukünftigen technischen Prozesses zur Herstellung von chiralen Alkoholen beitragen. Weitere Untersuchungen (Regeneration des Elektronenakzeptors in einen elektrochemischen Reaktor, Immobilisierung des Enzyms, Ganzellbiotransformation) wurden bzw. werden in

Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Szaleniec bereits durchgeführt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Herstellung von chiralen Alkoholen durch die stereospezifische Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen mit der EbDH als alternativer Ansatz neben der Verwendung von Alkoholdehydrogenasen zur Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoholen betrachtet werden kann. Die größten Vorteile des EbDH-System wären dabei die Unabhängigkeit von Sauerstoff und von teuren Cofaktoren wie NADH. Erst kürzlich wurde über eine Häm-Thiolat-Peroxidase aus dem Pilz *Agrocybe aegerita* berichtet, die ebenfalls alkylierte mono- und bityklische Aromaten stereospezifisch zu den jeweiligen Alkoholen hydroxyliert (Kluge et al., 2012). Auch hier müssen dem System jedoch Sauerstoff und Reduktionsäquivalente zugeführt werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt aus dem Bereich der angewandten Forschung in dieser Arbeit war die Entdeckung der isoelektrischen und isosterischen Ethylbenzolanaloge *N*- und *B*-Ethyl-1,2-Azaborin als Inhibitoren der EbDH. Damit wurde zum ersten Mal eine biologische Funktion dieser neuartigen, artifiziellen Substanzen festgestellt und damit der Nachweis des Konzepts erbracht, dass BN-CC Isosterie zu neuartigen Verbindungen mit neuen Eigenschaften führen kann. Rein prinzipiell sollte die biologische Aktivität solcher BN-CC isosterischen Substanzen deshalb nicht auf bakterielle Systeme beschränkt sein. Durch die Verwendung von neuartigen BN-CC isosterischen Verbindungen könnten sich daher möglicherweise auch neue Möglichkeiten im Bereich biomedizinischer Forschung bzw. klinischer Chemie eröffnen. Denkbar wäre es z.B. bestimmte C-C-Strukturmerkmale von körpereigenen aromatischen Molekülen durch die B-N-Struktur zu ersetzen, was die biologischen Eigenschaften der Stoffe in eine bestimmte Richtung verändern könnte. Da viele körpereigene Stoffe wie Hormone und Vitamine oder auch Aminosäuren, Nukleinbasen oder körperfremde Stoffe wie Flavonoide eine aromatische Leistruktur aufweisen ergeben sich durch die Synthese von BN-CC isosterischen Derivaten dieser Verbindungen vielfältige Möglichkeiten in der biomedizinischen Forschung.

3. Anaerober Abbau von Alkanen in *Desulfococcus oleovorans*

Zur Untersuchung des anaeroben Alkanabbauweges in *D. oleovorans* wurden die Zellextrakte von Kulturen, die auf Hexadecan als Alkansubstrat und auf Palmitat als Kontrolle kultiviert wurden, auf induzierte Proteine untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass ausschließlich in der Kultur die auf Hexadecan kultiviert wurde, die drei Untereinheiten eines EbDH-ähnlichen Molybdänenzym vorhanden waren. Aufgrund dessen wird eine Hydroxylierung der Alkankette als mögliche Initialreaktion postuliert. Diese Annahme wird unterstützt durch das Wachstum des Bakterienstamms auf 2-Hexadecanol, welches das vorhergesagte Produkt der Hydroxylierung von Hexadecan an der C2 Position ist. Diese

Vorhersage ergibt sich aus der hohen Ähnlichkeit des Alkanhydroxylierenden Enzyms zur EbDH, die für die Hydroxylierung von Ethylbenzol spezifisch am sekundären Kohlenstoffatom des Ethylsubstituenten ansetzt. Im Falle der Steroid C25 dehydrogenase von *S. denitrificans*, die ebenfalls große Ähnlichkeit zu EbDH aufweist, findet die Hydroxylierung der Steroidsubstrate an einem tertiären Kohlenstoffatom statt (Dermer und Fuchs, 2012). Sowohl die Hydroxylierung von sekundären wie tertiären Kohlenstoffatomen ist dabei energetisch deutlich günstiger als die von primären Kohlenstoffatomen (Berechnungen von Dr. M. Szaleniec, mündliche Mitteilung). Zum Vergleich kann auch aufgeführt werden, dass das hydroxylierte C1-Atom des EbDH Substrats Ethylbenzol ein sekundäres C-Atom ist, während das C1-Atom des EbDH Inhibitors Toluol ein primäres C-Atom ist und deshalb offenbar nicht hydroxyliert werden kann. Neben dem Wachstum auf 2-Hexadecanol war für *D. oleovorans* beschrieben, dass der Stamm ebenso auf 1-Hexadecanol wachsen kann (Aeckersberg et al., 1991). Die Kultivierung von *D. oleovorans* auf 1-Hexadecanol gelang in dieser Arbeit jedoch bislang nicht. 1-Hexadecanol wird als mögliches Intermediat des anaeroben Alkanabbaus betrachtet, der vermutlich durch die Hydratisierung der Alkendoppelbindung eingeleitet wird (unveröffentlichte Daten).

Nach der postulierten Hydroxylierung von Hexadecan zu 2-Hexadecanol als Initialreaktion des anaeroben Alkanabbaus in *D. oleovorans*, wäre ein weiterer Abbau zum korrespondierenden Keton, Carboxylierung am C3 zu einer 2-Acetylfettsäure und deren anschließender Abbau mittels β -Oxidation denkbar. Tatsächlich wurden in weiterführenden Versuchen zum anaeroben Alkanabbau in *D. oleovorans* induzierte Enzyme in auf Hexadecan kultivierten Zellen gefunden, die diese Reaktionen katalysieren könnten (Katharina Sünwoldt, unveröffentlichte Daten). Darunter befinden sich Enzyme der β -Oxidation wie eine AMP-abhängige Synthetase/Ligase, eine Acyl-CoA Dehydrogenase, eine 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase und eine Acetyl-CoA Acetyltransferase. Als mögliche Initialreaktion des anaeroben Alkanabbaus in *D. oleovorans* wurde bisher eine Carboxylierung am C3 Atom der Alkankette postuliert, auf die eine β -Oxidation und die Abspaltung einer C2 Einheit folgt (So et al., 2003). Beide postulierten Wege führen letztlich dazu, dass *D. oleovorans* aus geradkettigen Alkanen Fettsäuren mit einer ungeraden Kohlenstoffkette produziert, und umgekehrt. Basierend auf den Ergebnissen von So et al. (2003) und den Ergebnissen dieser Dissertation wird ein neuer Abbauweg postuliert, der die Hydroxylierung vor der Carboxylierung der Alkankette fordert und zugleich alle derzeitigen Erkenntnisse über den möglichen Abbauweg miteinschließt (Abb. 24). Abschließend ist jedoch zu sagen, dass eine Carboxylase bis heute noch nicht als induziertes Protein in auf Hexadecan kultivierten Zellen identifiziert werden konnte.

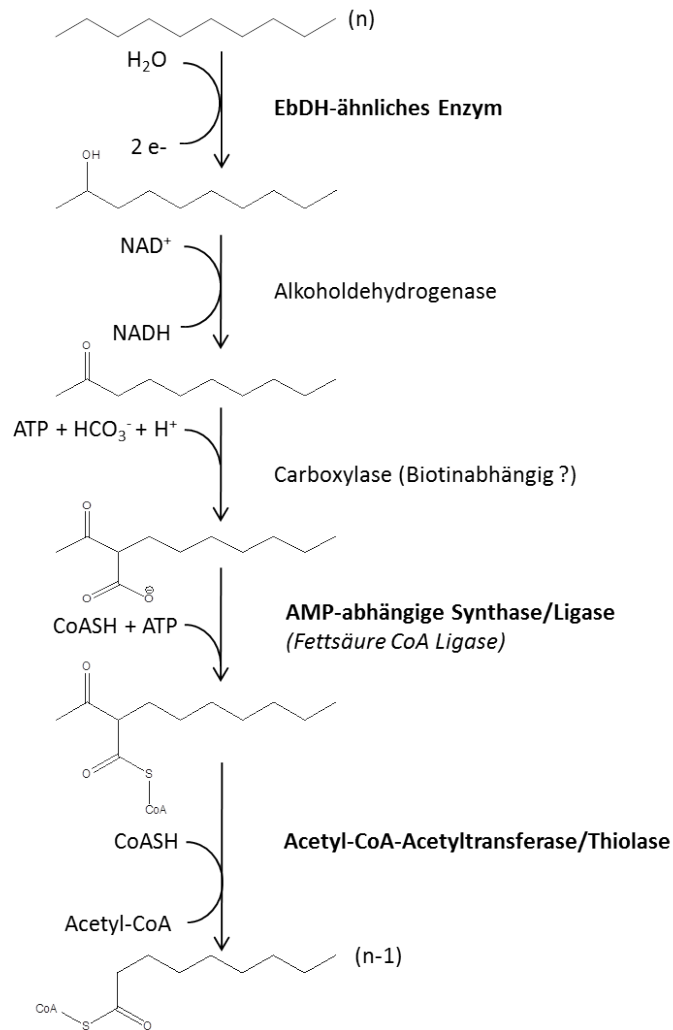


Abb. 24: Postulierter anaerober Alkanabauweg in *D. oleovorans*. Als Initialreaktion wird eine Hydroxylierung am C2 Atom der Alkankette durch ein EbDH-ähnliches Molybdänenzym postuliert. Daraufgehend wird der Alkohol zum Keton oxidiert, am C3 Atom carboxyliert und anschließend durch eine Fettsäure-CoA-Ligase aktiviert. Anschließend erfolgt eine thiolytische Spaltung des 3-Ketoacyl-CoA-Intermediats durch eine Acetyl-CoA-Acetyltransferase in ein Acetyl-CoA und ein Acyl-CoA mit einem gegenüber der Alkankette um ein C-Atom verkürzten Alkylrest. Die Fettgedruckten Enzymnamen repräsentieren Enzyme die in auf Hexadecan kultivierten Zellen induziert sind.

Zur Verifizierung der postulierten Hydroxylierungsaktivität des EbDH-ähnlichen Enzyms müsste das Enzym biochemisch charakterisiert werden. Dies war in dieser Arbeit nicht möglich, da mit den *D. oleovorans* Kulturen zu wenig Zellmasse für eine Reinigung des nativen Enzyms erhalten wurden. Da dies ein prinzipielles Problem bei sulfatreduzierenden Mikroorganismen ist, wurden die Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms in dieser Arbeit zusammen mit dem Gen des Chaperons kloniert und eine erste Überexpression in *E. coli* durchgeführt. Nach SDS-PAGE Analyse wurden allerdings nur die β - und die γ -Untereinheit überproduziert (Daten nicht gezeigt). In zukünftigen Experimenten soll die Überexpression

der Gene weiter optimiert werden. Erste Ansätze dazu wären eine andere Anordnung der Gene im Expressionsvektor, Hinzufügen der Gene die stromabwärts und stromaufwärts der Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms liegen, oder Verwendung von *A. aromaticum* als Überexpressionsstamm.

Die Gene, die für das EbDH-ähnliche Enzym von *D. oleovorans* kodieren, sind zusammen in einem Operon mit dem Gen für ein Chaperon des TorD-Typs im Genom von *D. oleovorans* organisiert (Abb. 25). Stromabwärts dieses Operons liegen die Gene für ein Cytochrom b_6 mit 4 vorhergesagten Transmembranhelices, ein Cytochrom b -ähnliches Protein mit 5 vorhergesagten Transmembranhelices und einen Cytochrom c_1 Oktahäm-Komplex mit einer vorhergesagten Transmembranhelix). Einige hundert Basenpaare weiter stromabwärts finden sich zudem Gene, die für eine Acyl-CoA Dehydrogenase eines β -Oxidationswegs kodieren, und Gene deren Proteinprodukte an der Molybdäncofaktorbiosynthese und am Molybdäntransport beteiligt sind. Stromaufwärts der Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms liegen Gene für ein Ferredoxin mit einer vorhergesagten Transmembranhelix, ein Rieske-Eisen-Schwefel-Protein mit einer vorhergesagten Transmembranhelix und ein unbekanntes Membranprotein (Dole191; 4 vorhergesagte Transmembranhelices). Einige hundert Basenpaare weiter stromaufwärts findet sich weitere Gene, die für Enzyme der β -Oxidation kodieren (Acetyl-CoA-Acetyltransferase, Enoyl-CoA-Reduktase, 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase) sowie eine Gen für eine kurzkettige Alkoholdehydrogenase. Die Tatsache, dass Gene, deren Proteinprodukte an der Molybdäncofaktorbiosynthese, dem Molybdäntransport sowie dem postulierten Alkanabbauweg beteiligt sind, im genomischen Kontext des EbDH-ähnlichen Enzyms liegen, passt sehr gut zu dem postulierten anaeroben Alkanabbauweg in *D. oleovorans*. Im Gegensatz zum genomischen Kontext des Operons der EbDH aus *A. aromaticum* EbN1 befinden sich jedoch in *D. oleovorans* keine weiteren Gene des spezifischen Abbauweges in direkter Nähe des Operons das für das initiale Enzym kodiert (Rabus et al., 2002). Zudem fehlen in *D. oleovorans* Gene für die Regulierung der Alkanabbau Operons (Abb. 25; Rabus, 2005). Die Gene, die direkt an das Operon des EbDH-ähnlichen Enzyms in *D. oleovorans* angrenzen, haben dagegen keine Gegenstücke im genomischen Kontext des EbDH Operons in *A. aromaticum*. Da die postulierte Aktivierung der Alkankette am C2 Atom durch das EbDH-ähnliche Enzym unter physiologischen Normalbedingungen jedoch energetisch ungünstiger sein soll als z.B. die Aktivierung des C1 Atoms des Ethylsubstituenten von Ethylbenzol oder die Aktivierung des C25 Atoms von Cholesterin (Berechnung von Dr. Szaleniec, mündliche Mitteilung), könnten die Häm- und Eisen-Schwefel-Cluster-enthaltenden Proteine, deren Gene stromaufwärts und stromabwärts des Operons des EbDH-ähnlichen Enzyms liegen, obligat für die Funktion des EbDH-ähnlichen Enzyms sein. Vorstellbar wäre, dass das EbDH-ähnliche Enzym zusammen mit den Häm- und Eisen-Schwefel-Cluster-enthaltenden Proteine einen Multiproteinkomplex

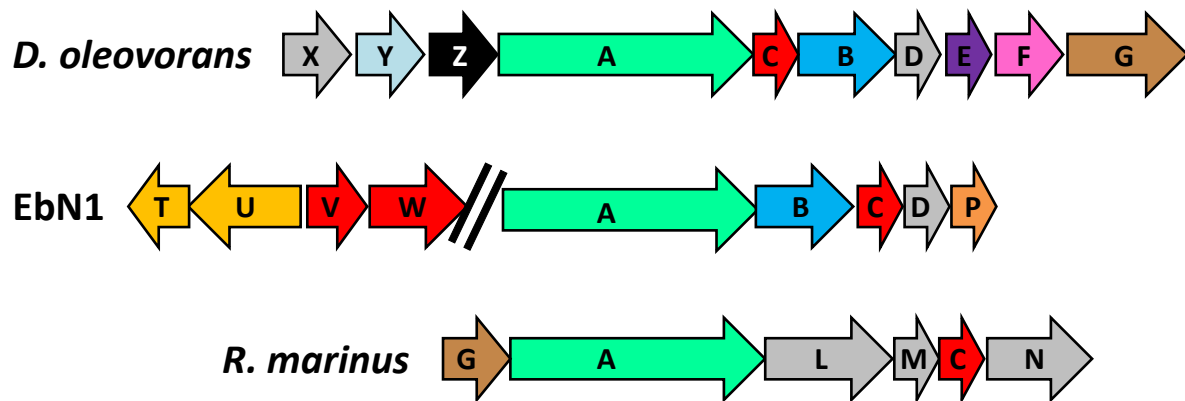


Abb. 25: Schematischer Vergleich der Organisation der Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans*, der EbDH aus *A. aromaticum* EbN1 und des alternativen Komplex III aus *Rhodothermus marinus* sowie deren genomischen Kontext. Oben: Stromaufwärts der Gene des EbDH-ähnlichen Enzyms (ACB) + Chaperon (D) liegen die Gene für ein Ferredoxin (Z), ein Rieske Protein (Y) und ein unbekanntes Protein (X), stromabwärts die Gene für ein Cytochrom b_6 (E), ein Cytochrom b -ähnliches Protein (F) und einen Cytochrom c_1 Oktahäm (G). Mitte: Stromaufwärts der Gene der EbDH (ABC) + Chaperon (D) liegen u.a. die Gene der Zweikomponentensystem die den Ethylbenzolabbau regulieren (VW: *AdiSR: Acetophenone degradation inducing sensor/regulator*; TU: *EdiSR: Ethylbenzene degradation inducing sensor/regulator*). Stromabwärts des EbDH Operons liegt das Gen welches für das zweite Enzym des Ethylbenzolabbauweges kodiert, die (S)-1-Phenylethanoldehydrogenase (P; *ped*). Unten: Operon welches die Gene für den alternativen Komplex III beherbergt. G: Gen eines Pentahäm c. A: Fusionsgen aus dem Gen einer Molybdopterin-oxido-reduktase und einem Eisen-Schwefel Protein. C: Gen eines Cytochrom c. LMN: Gene die für Proteine mit mehreren Transmembranhelices kodieren. Die Farbgebung und Benennung der einzelnen Gene soll insbesondere die Gemeinsamkeiten der Gene hervorheben die für die Untereinheiten der Molybdänenzyme bzw. der echten und putativen Untereinheiten des alternativen Komplex III kodieren.

bildet. Ein Modell für diesen möglichen Multiproteinkomplex zeigt Abb. 26. Aufgrund der TAT Signalsequenz und der Abwesenheit von Transmembranhelices (nicht vorhergesagt) wird angenommen, dass das EbDH-ähnliche Enzym, wie die EbDH, löslich im Periplasma lokalisiert ist. Die durch die Oxidation/Hydroxylierung von den Alkan substraten abgezogenen Elektronen werden wie bei der EbDH vom Molybdäncofaktor über die Eisen-Schwefel-Cluster zum Häm transportiert. Von dort aus werden die Elektronen auf einen Cytochrom bc_1 ähnlichen Komplex (bzw. Komplex III-ähnlich), bestehend aus einem Cytochrom c_1 (Oktahäm), einem Cytochrom b_6 , einem Cytochrom b ähnlichen Protein und einem Rieske Eisen-Schwefel-Protein, übertragen. Von dort könnten die Elektronen auf das Menachinon der Membran übertragen werden, die die Elektronen in die Atmungskette zur Sulfatreduktion einspeisen. Die mögliche Funktion des Ferredoxins und des unbekannten Membranproteins sind unklar, beide gehören aber sehr wahrscheinlich mit den weiteren Proteinen zu einem

gemeinsamen Komplex. Das postulierte Model ermöglicht wie beim Komplex III der mitochondrialen Atmungskette eine thermodynamische Umkehr des Elektronenflusses, die durch den Protonen- (bzw. Na^+) Gradienten der Membran angetrieben werden könnte (reverser Elektronentransport). Die Umkehr des Elektronenflusses müsste mit einem Verbrauch des Protonengradienten einhergehen, welcher die ATP Ausbeute verringert und das langsame Wachstum von *D. oleovorans* auf Alkansubstraten erklären könnte.

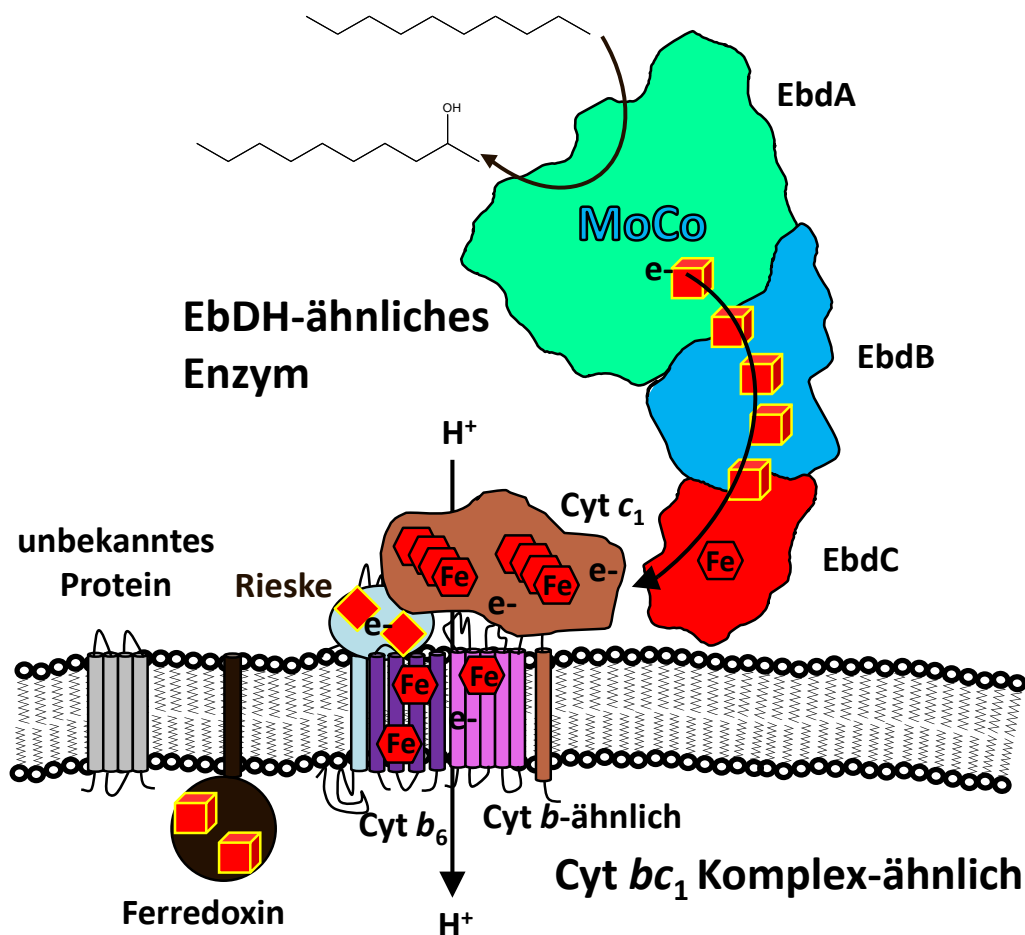


Abb. 26: Schematisches Model der möglichen Funktion des EbDH-ähnlichen Enzyms aus *D. oleovorans*. Postuliert wird die Hydroxylierung von Alkansubstraten (hier: Decan) an der C2 Position katalysiert durch das EbDH-ähnliche Enzym. Die Elektronen werden anschließend über die Eisen-Schwefel-Cluster und das Häm innerhalb des Enzyms auf einen Cytochrom *bc1*-ähnlichen Komplex übertragen. Für mehr Informationen, siehe Text.

In den letzten Jahren wurden in den Genomen von Sulfatreduzierern Komplex III-ähnliche Multiproteinkomplexe entdeckt und z.T. biochemisch charakterisiert, die modular aufgebaut sind und sich aus katalytischen Modulen/Untereinheiten (sehr oft Molybdopterin Oxidoreduktasen) und membranständigen Redoxmodulen bestehen die zwischen verschiedenen Elektronenüberträgern vermitteln (sehr oft Chinone; Grein et al., 2013). Insbesondere der alternative Komplex III (ACIII) scheint sowohl von der Genorganisation im

Operon als auch vom strukturellen Aufbau des Proteinkomplexes dem hier postulierten Modell sehr ähnlich zu sein (Abb. 25; Pereira et al., 2007; Refojo et al., 2010). Insbesondere das Vorhandensein einer putativen Molybdopterinoxidoreduktase aus der DMSO Reduktase Familie als katalytischer Untereinheit die mit einem Eisen-Schwefel-Protein fusioniert ist, welches Bindedomänen für drei [4Fe-4S] Cluster und einen [3Fe-4S] Cluster enthält, sowie das Vorhandensein eines Pentahäm-Cytochrom *c* (Vergleiche Oktahäm Cytochrom *c* von *D. oleovorans*) ähnelt stark dem hier vorgeschlagenen Model. Interessanterweise konnte jedoch biochemisch noch nie ein Molybdäncofaktor im gereinigten ACIII Proteinkomplex nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

Aeckersberg, F.; Bak, F.; Widdel, F. (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* 156(1): 5-14.

Aeckersberg, F.; Rainey, F. A.; Widdel, F. (1998). Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* 170(5): 361-369.

Axley, M. J.; Böck, A.; Stadtman, T. C. (1991). Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(19): 8450-8454.

Ball, H. A.; Johnson, H. A.; Reinhard, M.; Spormann, A. M. (1996). Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB-1. *Journal of Bacteriology* 178(19): 5755-5761.

Bimboim, H. C.; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513-1523.

Birch, A. J.; Hinde, A. L.; Radom, L. (1980). A theoretical approach to the birch reduction. Structures and stabilities of the radical anions of substituted benzenes. *Journal of the American Chemical Society* 102(10): 3370-3376.

Boll, M.; Fuchs, G.; Heider, J. (2002). Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Current Opinion in Chemical Biology* 6(5): 604-611.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Callaghan, A. V.; Gieg, L. M.; Kropp, K. G.; Suflita, J. M.; Young, L. Y. (2006). Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 4274-4282.

Callaghan, A. V.; Wawrik, B.; Ní Chadhain, S. M.; Young, L. Y.; Zylstra, G. J. (2008). Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366(1): 142-148.

Cline, J. D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology & Oceanography* 14(3): 454-458.

Cornish-Bowden, A. (1995). Analysis of enzyme kinetic data. Oxford University Press, Oxford and New York.

Dermer, J.; Fuchs, G. (2012). Molybdoenzyme that catalyzes the anaerobic hydroxylation of a tertiary carbon atom in the side chain of cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 287(44): 36905-36916.

Ehrenreich, P.; Behrends, A.; Harder, J.; Widdel, F. (2000). Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* 173(1): 58-64.

Fuchs, G.; Boll, M.; Heider, J. (2011). Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology* 9(11): 803-816.

- Genest, O.; Méjean, V.; Iobbi-Nivol, C. (2009).** Multiple roles of TorD-like chaperones in the biogenesis of molybdoenzymes. *FEMS Microbiology Letters* 297(1): 1-9.
- Gibson, D. T.; Parales, R. E. (2000).** Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11(3): 236-243.
- Giordani, R.; Buc, J.; Cornish-Bowden, A.; Cárdenas, M. L. (1997).** Kinetics of membrane-bound nitrate reductase from *Escherichia coli* with analogues of physiological electron donors. *European Journal of Biochemistry* 250(2): 567-577.
- Grein, F.; Ramos, A. R.; Venceslau, S. S.; Pereira, I. A. C. (2013).** Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827(2): 145-160.
- Grundmann, O.; Behrends, A.; Rabus, R.; Amann, J.; Halder, T.; Heider, J.; Widdel, F. (2008).** Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of *n*-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1. *Environmental Microbiology* 10(2): 376-385.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4): 557-580.
- Heider, J. (2007).** Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* 11(2): 188-194.
- Heider, J. (2008).** Bakterieller Kohlenwasserstoff-Abbau — Es geht auch ohne Sauerstoff. *Biospektrum* 14(01.08): 28-31.
- Heider, J.; Forchhammer, K.; Sowers, G.; Böck, A. (1991).** Interspecies compatibility of selenoprotein biosynthesis in Enterobacteriaceae. *Archives of Microbiology* 155(3): 221-228.
- Heider, J.; Fuchs, G. (1997).** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry* 243(3): 577-596.
- Heider, J.; Spormann, A. M.; Beller, H. R.; Widdel, F. (1998).** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 22(5): 459-473.
- Hille, R. (1996).** The mononuclear molybdenum enzymes. *Chemical Reviews* 96(7): 2757-2816.
- Hille, R.; Rétey, J.; Bartlewski-Hof, U.; Reichenbecher, W.; Schink, B. (1998).** Mechanistic aspects of molybdenum-containing enzymes. *FEMS Microbiology Reviews* 22(5): 489-501.
- Höffken, H. W.; Duong, M.; Friedrich, T.; Breuer, M.; Hauer, B.; Reinhardt, R.; Rabus, R.; Heider, J. (2005).** Crystal structure and enzyme kinetics of the (S)-specific 1-phenylethanol dehydrogenase of the denitrifying bacterium strain EbN1. *Biochemistry* 45(1): 82-93.
- Holland, H. L.; Brown, F. M.; Munoz, B.; Ninniss, R. W. (1988).** Side chain hydroxylation of aromatic hydrocarbons by fungi. Part 2. Isotope effects and mechanism. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (8): 1557-1563.
- Hopper, D. J.; Bossert, I. D.; Rhodes-Roberts, M. E. (1991).** *p*-cresol methylhydroxylase from a denitrifying bacterium involved in anaerobic degradation of *p*-cresol. *Journal of Bacteriology* 173(3): 1298-1301.
- Jarling, R.; Sadeghi, M.; Drozdowska, M.; Lahme, S.; Buckel, W.; Rabus, R.; Widdel, F.; Golding, B. T.; Wilkes, H. (2012).** Stereochemical investigations reveal the mechanism of

the bacterial activation of *n*-alkanes without oxygen. *Angewandte Chemie International Edition* 51(6): 1334-1338.

Jobst, B.; Schühle, K.; Linne, U.; Heider, J. (2010). ATP-dependent carboxylation of acetophenone by a novel type of carboxylase. *Journal of Bacteriology* 192(5): 1387-1394.

Johnson, H. A.; Pelletier, D. A.; Spormann, A. M. (2001). Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *Journal of Bacteriology* 183(15): 4536-4542.

Johnson, H. A.; Spormann, A. M. (1999). In vitro studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene mineralization. *Journal of Bacteriology* 181(18): 5662-5668.

Kisker, C.; Schindelin, H.; Baas, D.; Rétey, J.; Meckenstock, R. U.; Kroneck, P. M. H. (1998). A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiology Reviews* 22(5): 503-521.

Kloer, D. P.; Hagel, C.; Heider, J.; Schulz, G. E. (2006). Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*. *Structure* 14(9): 1377-1388.

Kluge, M.; Ullrich, R.; Scheibner, K.; Hofrichter, M. (2012). Stereoselective benzylic hydroxylation of alkylbenzenes and epoxidation of styrene derivatives catalyzed by the peroxxygenase of *Agrocybe aegerita*. *Green Chemistry* 14(2): 440-446.

Kniemeyer, O.; Fischer, T.; Wilkes, H.; Glöckner, F. O.; Widdel, F. (2003). Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 760-768.

Kniemeyer, O.; Heider, J. (2001). Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 276(24): 21381-21386.

Kniemeyer, O.; Musat, F.; Sievert, S. M.; Knittel, K.; Wilkes, H.; Blumenberg, M.; Michaelis, W.; Classen, A.; Bolm, C.; Joye, S. B.; Widdel, F. (2007). Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* 449(7164): 898-901.

Kröger, A.; Winkler, E.; Innerhofer, A.; Hackenberg, H.; Schägger, H. (1979). The formate dehydrogenase involved in electron transport from formate to fumarate in *Vibrio succinogenes*. *European Journal of Biochemistry* 94(2): 465-475.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

Leuthner, B.; Leutwein, C.; Schulz, H.; Hörth, P.; Haehnel, W.; Schiltz, E.; Schägger, H.; Heider, J. (1998). Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Molecular Microbiology* 28(3): 615-628.

Leutwein, C.; Heider, J. (1999). Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (*R*)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology* 145(11): 3265-3271.

Lovley, D. R.; Giovannoni, S. J.; White, D. C.; Champine, J. E.; Phillips, E. J.; Gorby, Y. A.; Goodwin, S. (1993). *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology* 159(4): 336-344.

- McDevitt, C. A.; Hugenholtz, P.; Hanson, G. R.; McEwan, A. G. (2002).** Molecular analysis of dimethyl sulphide dehydrogenase from *Rhodovulum sulfidophilum*: its place in the dimethyl sulfoxide reductase family of microbial molybdopterin-containing enzymes. *Molecular Microbiology* 44(6): 1575-1587.
- Meckenstock, R. U.; Krieger, R.; Ensign, S.; Kroneck, P. M. H.; Schink, B. (1999).** Acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*. *European Journal of Biochemistry* 264(1): 176-182.
- Morpeth, F. F.; Boxer, D. H. (1985).** Kinetic analysis of respiratory nitrate reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry* 24(1): 40-46.
- Pereira, M. M.; Refojo, P. N.; Hreggvidsson, G. O.; Hjorleifsdottir, S.; Teixeira, M. (2007).** The alternative complex III from *Rhodothermus marinus* – A prototype of a new family of quinol:electron acceptor oxidoreductases. *FEBS Letters* 581(25): 4831-4835.
- Pérez-Pantoja, D.; González, B.; Pieper, D. H. (2010).** Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. Chapter 4, pp. 799-837. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. /Timmis, K. N., Springer, Berlin, Heidelberg.
- Rabus, R. (2005).** Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68(5): 580-587.
- Rabus, R.; Heider, J. (1998).** Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate reducing bacteria. *Archives of Microbiology* 170(5): 377-384.
- Rabus, R.; Kube, M.; Beck, A.; Widdel, F.; Reinhardt, R. (2002).** Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* 178(6): 506-516.
- Rabus, R.; Nordhaus, R.; Ludwig, W.; Widdel, F. (1993).** Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 59(5): 1444-1451.
- Rabus, R.; Widdel, F. (1995).** Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* 163(2): 96-103.
- Rabus, R.; Wilkes, H.; Behrends, A.; Armstroff, A.; Fischer, T.; Pierik, A. J.; Widdel, F. (2001).** Anaerobic initial reaction of *n*-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in *n*-hexane metabolism. *Journal of Bacteriology* 183(5): 1707-1715.
- Refojo, P. N.; Sousa, F. L.; Teixeira, M.; Pereira, M. M. (2010).** The alternative complex III: A different architecture using known building modules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797(12): 1869-1876.
- Romao, M. J. (2009).** Molybdenum and tungsten enzymes: a crystallographic and mechanistic overview. *Dalton Transactions* (21): 4053-4068.
- Rosner, B. M.; Rainey, F. A.; Kroppenstedt, R. M.; Schink, B. (1997).** Acetylene degradation by new isolates of aerobic bacteria and comparison of acetylene hydratase enzymes. *FEMS Microbiology Letters* 148(2): 175-180.
- Rosner, B. M.; Schink, B. (1995).** Purification and characterization of acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*, a tungsten iron-sulfur protein. *Journal of Bacteriology* 177(20): 5767-5772.

- Rueter, P.; Rabus, R.; Wilkest, H.; Aeckersberg, F.; Rainey, F. A.; Jannasch, H. W.; Widdel, F. (1994).** Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372(6505): 455-458.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Sambrook, J. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual / Sambrook, J.; Russell, D. W., Cold Spring Harbor, New York.
- Segel, I. H. (1975).** Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems / Segel, I. H., Wiley, New York.
- Seiffert, G. B.; Ullmann, G. M.; Messerschmidt, A.; Schink, B.; Kroneck, P. M. H.; Einsle, O. (2007).** Structure of the non-redox-active tungsten/[4Fe:4S] enzyme acetylene hydratase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(9): 3073-3077.
- Small, F. J.; Ensign, S. A. (1997).** Alkene Monooxygenase from *Xanthobacter* Strain Py2: purification and characterization of a four-component system central to the bacterial metabolism of aliphatic alkenes. *Journal of Biological Chemistry* 272(40): 24913-24920.
- So, C. M.; Phelps, C. D.; Young, L. Y. (2003).** Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 3892-3900.
- So, C. M.; Young, L. Y. (1999).** Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 65(7): 2969-2976.
- Spormann, A. M.; Widdel, F. (2000).** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11(2-3): 85-105.
- Szaleniec, M.; Borowski, T.; Schuhle, K.; Witko, M.; Heider, J. (2010).** Ab initio modeling of ethylbenzene dehydrogenase reaction mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 132(17): 6014-6024.
- Szaleniec, M.; Hagel, C.; Menke, M.; Nowak, P.; Witko, M.; Heider, J. (2007).** Kinetics and mechanism of oxygen-independent hydrocarbon hydroxylation by ethylbenzene dehydrogenase. *Biochemistry* 46(25): 7637-7646.
- Szaleniec, M.; Salwinski, A.; Borowski, T.; Heider, J.; Witko, M. (2012).** Quantum chemical modeling studies of ethylbenzene dehydrogenase activity. *International Journal of Quantum Chemistry* 112(8): 1990-1999.
- Szaleniec, M.; Witko, M.; Heider, J. (2008).** Quantum chemical modelling of the C-H cleavage mechanism in oxidation of ethylbenzene and its derivatives by ethylbenzene dehydrogenase. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 286(1-2): 128-136.
- Szaleniec, M.; Witko, M.; Tadeusiewicz, R.; Goclon, J. (2006).** Application of artificial neural networks and DFT-based parameters for prediction of reaction kinetics of ethylbenzene dehydrogenase. *Journal of Computer Aided Molecular Design* 20(3): 145-157.
- Tierney, M.; Young, L. Y. (2010).** Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons. Chapter 9, pp. 925-934. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* / Timmis, K. N., Springer, Berlin, Heidelberg.

- Van Beilen, J. B.; Li, Z.; Duetz, W. A.; M., S. T. H.; Witholt, B. (2003).** Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology – Revue d'IFP Energies Nouvelles* 58(4): 14.
- Wentzel, A.; Ellingsen, T. E.; Kotlar, H. K.; Zotchev, S. B.; Throne-Holst, M. (2007).** Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(6): 1209-1221.
- Widdel, F.; Grundmann, O. (2010).** Biochemistry of the anaerobic degradation of non-methane alkanes. Chapter 8, pp. 910-924. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. / Timmis, K. N., Springer, Berlin, Heidelberg.
- Widdel, F.; Rabus, R. (2001).** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 12(3): 259-276.
- Woodcock, D. M.; Crowther, P. J.; Doherty, J.; Jefferson, S.; DeCruz, E.; Noyer-Weidner, M.; Smith, S. S.; Michael, M. Z.; Graham, M. W. (1989).** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* 17(9): 3469-3478.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* 33(1): 103-119.
- Zengler, K.; Richnow, H. H.; Rossello-Mora, R.; Michaelis, W.; Widdel, F. (1999).** Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401(6750): 266-269.

Anhang

Tab. 10: Enzymaktivitäten der Ethylbenzol Dehydrogenase mit Ethylbenzol unter Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen organischen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel (LM)	rel. k_{cat} (%) mit 5 % LM	rel. k_{cat} (%) mit 10 % LM	rel. k_{cat} (%) mit 20 % LM	rel. k_{cat} (%) mit 30 % LM	rel. k_{cat} (%) mit 50 % LM
DMSO	nm	26 ± 3	18 ± 0	3 ± 1	nd
PEG400	nm	160 ± 9	160 ± 9	190 ± 9	110 ± 39
THF	nm	40 ± 4	22 ± 1	nd	nm
Diethylether	23 ± 5	25 ± 9	nm	nm	nm
DMF	59 ± 6	45 ± 1	22 ± 7	nm	nm
MTBE	66 ± 3	nm	nm	nm	nm
ACN	11 ± 11	nd	nm	nm	nm
<i>tert</i> -Butanol	11 ± 0	81 ± 4	13 ± 2	nm	nm
Ethylenglykol	76 ± 8	90 ± 1	nm	nm	nm

nm=nicht gemessen; nd=nicht detektiert

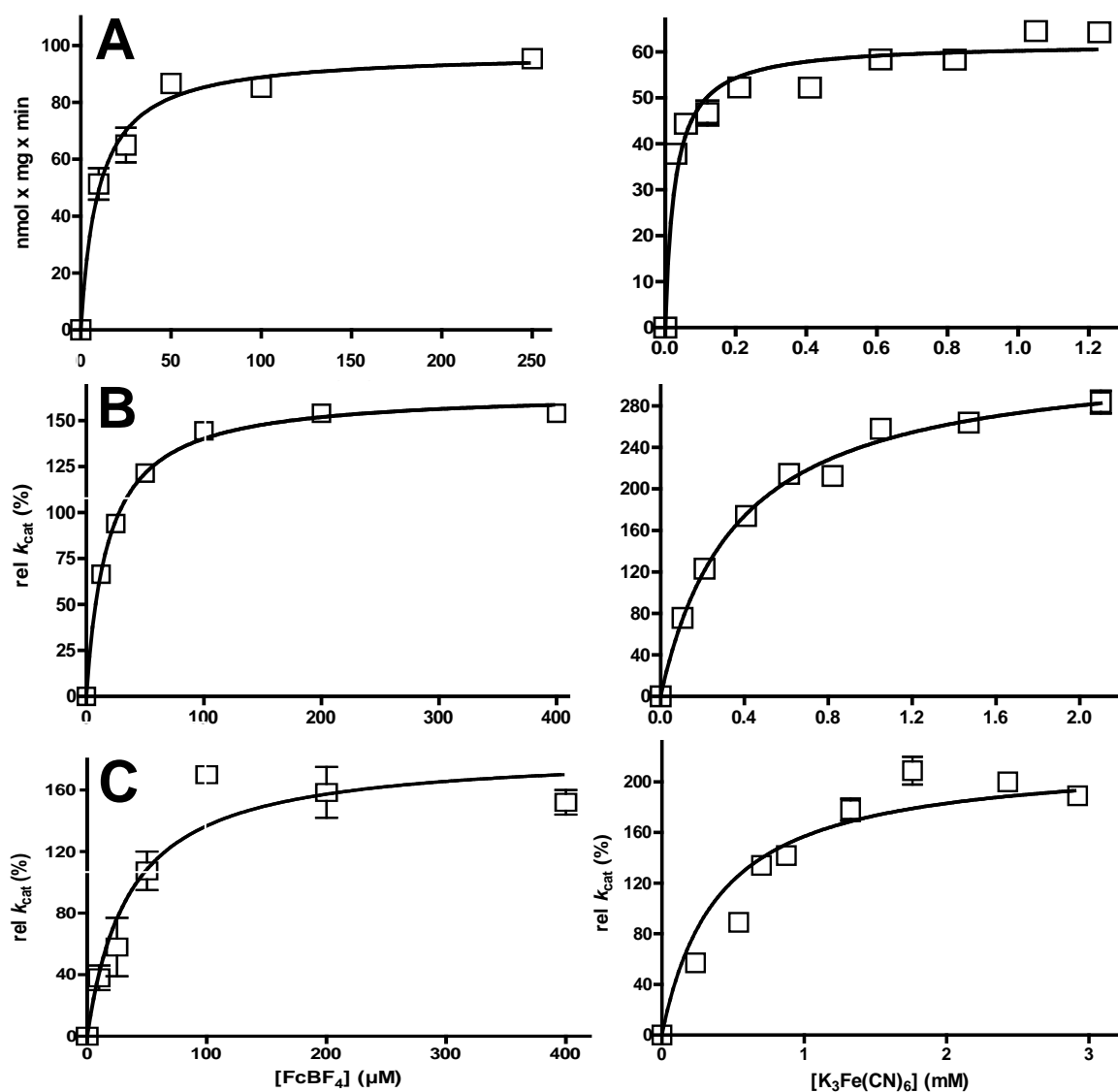


Abb. 27: Nicht-linearer Auftrag von Enzymaktivitäten von Ethylbenzol, 3-Phenyl-1-Propen und 3-Phenyl-1-Propin (je 100 μM) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen Ferriceniumtetrafluoroborat (FcBF₄; links) und Kaliumferricyanid (K₃Fe(CN)₆; rechts). A: Datensätze für Ethylbenzol B: Datensätze für 3-Phenyl-1-Propen C: Datensätze für 3-Phenyl-1-Propin.

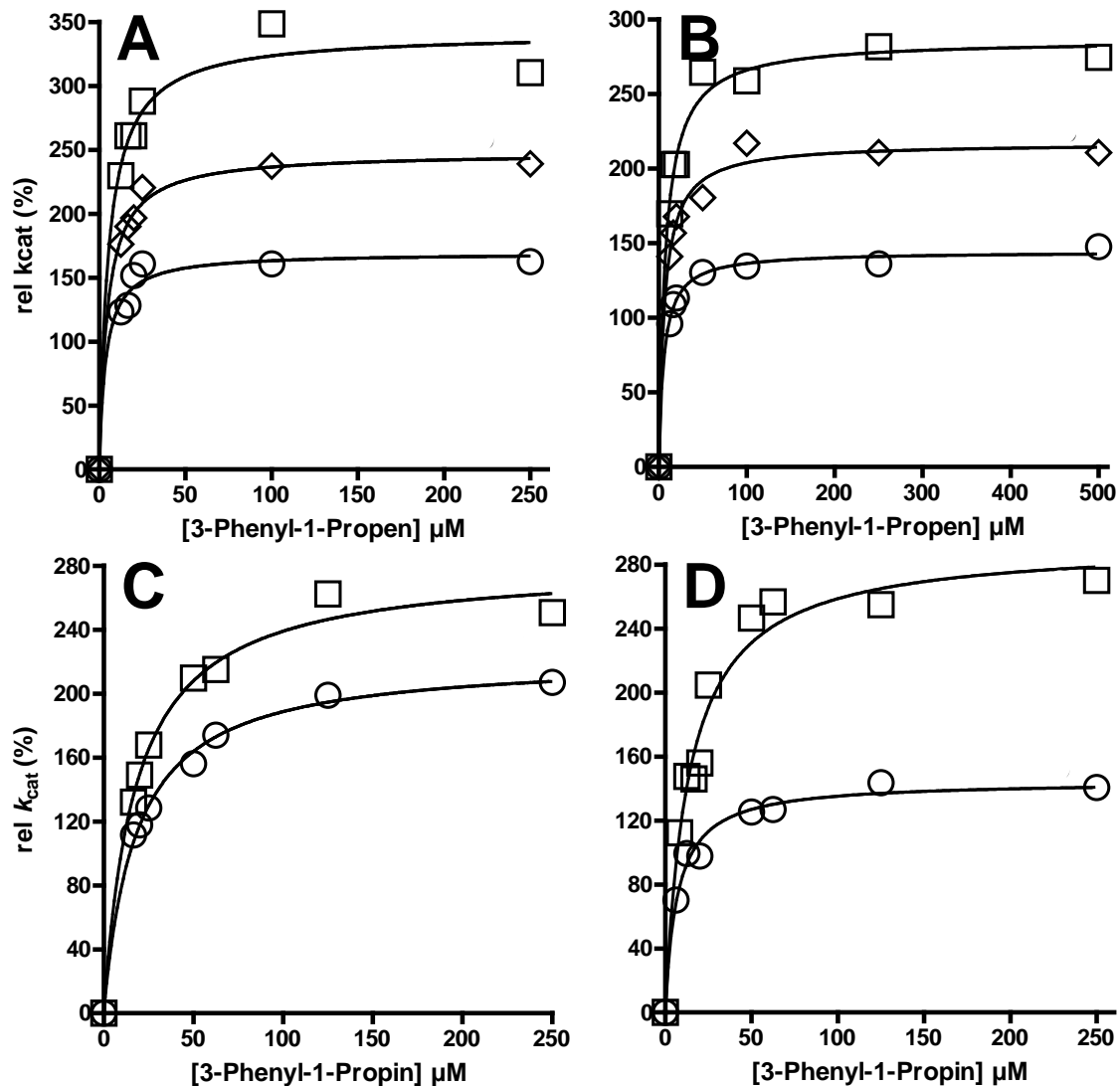


Abb. 28: Nicht-linearer Auftrag von Enzymaktivitäten von 3-Phenyl-1-Propen und 3-Phenyl-1-Propin in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen Ferriceniumtetrafluoroborat (FcBF_4) und Kaliumferricyanid ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). A: Datensatz für 3-Phenyl-1-Propen mit 200 μM FcBF_4 (Quadrate), 120 μM FcBF_4 (Rauten) und 60 μM FcBF_4 (Kreise). B: Datensatz für 3-Phenyl-1-Propen mit 1,7 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Quadrate), 1,2 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Rauten) und 0,56 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Kreise). C: Datensatz für 3-Phenyl-1-Propin mit 200 μM FcBF_4 (Quadrate) und 60 μM FcBF_4 (Kreise). D: Datensatz für 3-Phenyl-1-Propin mit 2,3 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Quadrate) und 0,56 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Kreise).

Tab. 11: Vergleich von apparenten enzymkinetischen Parametern von 3-Phenyl-1-propen und 3-Phenyl-1-propin in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen Ferriceniumtetrafluoroborat und Kaliumferricyanid

Elektronenakzeptor/ Konzentrationen	3-Phenyl-1-propen		3-Phenyl-1-propin	
	rel. k_{cat} (app)	$K_{\text{m}}A$ (app)	rel. k_{cat} (app)	$K_{\text{m}}A$ (app)
60 μM FcBF_4	170 % \pm 8	3,8 \pm 1,2 μM	220 % \pm 4	18 \pm 1 μM
120 μM FcBF_4	250 % \pm 5	4,8 \pm 0,6 μM	-	-
200 μM FcBF_4	340 % \pm 14	5,5 \pm 1,3 μM	280 % \pm 8	18 \pm 2 μM
0,56 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	140 % \pm 2	5,8 \pm 0,5 μM	150 % \pm 4	6,9 \pm 1 μM
1,2 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	220 % \pm 5	6,5 \pm 0,9 μM	-	-
1,7 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	290 % \pm 6	7,6 \pm 0,9 μM	-	-
2,3 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	-	-	290 % \pm 11	14 \pm 2 μM

Tab. 12: Vergleich von apparenten und realen enzymkinetischen Parametern von 3-Phenyl-1-propen und 3-Phenyl-1-propin

Substrat A	3-Phenyl-1-propen		3-Phenyl-1-propin	
	FcBF_4	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	FcBF_4	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
rel. k_{cat} (app)	340 % \pm 14	290 % \pm 6,0	280 % \pm 8	290 % \pm 11
rel. k_{cat} (real)	660 % \pm 73	590 % \pm 46	350 % \pm 16	430 % \pm 33
$K_{\text{m}}A$ (app)	5,5 \pm 1,3 μM	7,6 \pm 0,9 μM	18 \pm 2 μM	14 \pm 2 μM
$K_{\text{m}}A$ (real)	12 \pm 3 μM	18 \pm 2 μM	24 \pm 2 μM	19 \pm 3 μM

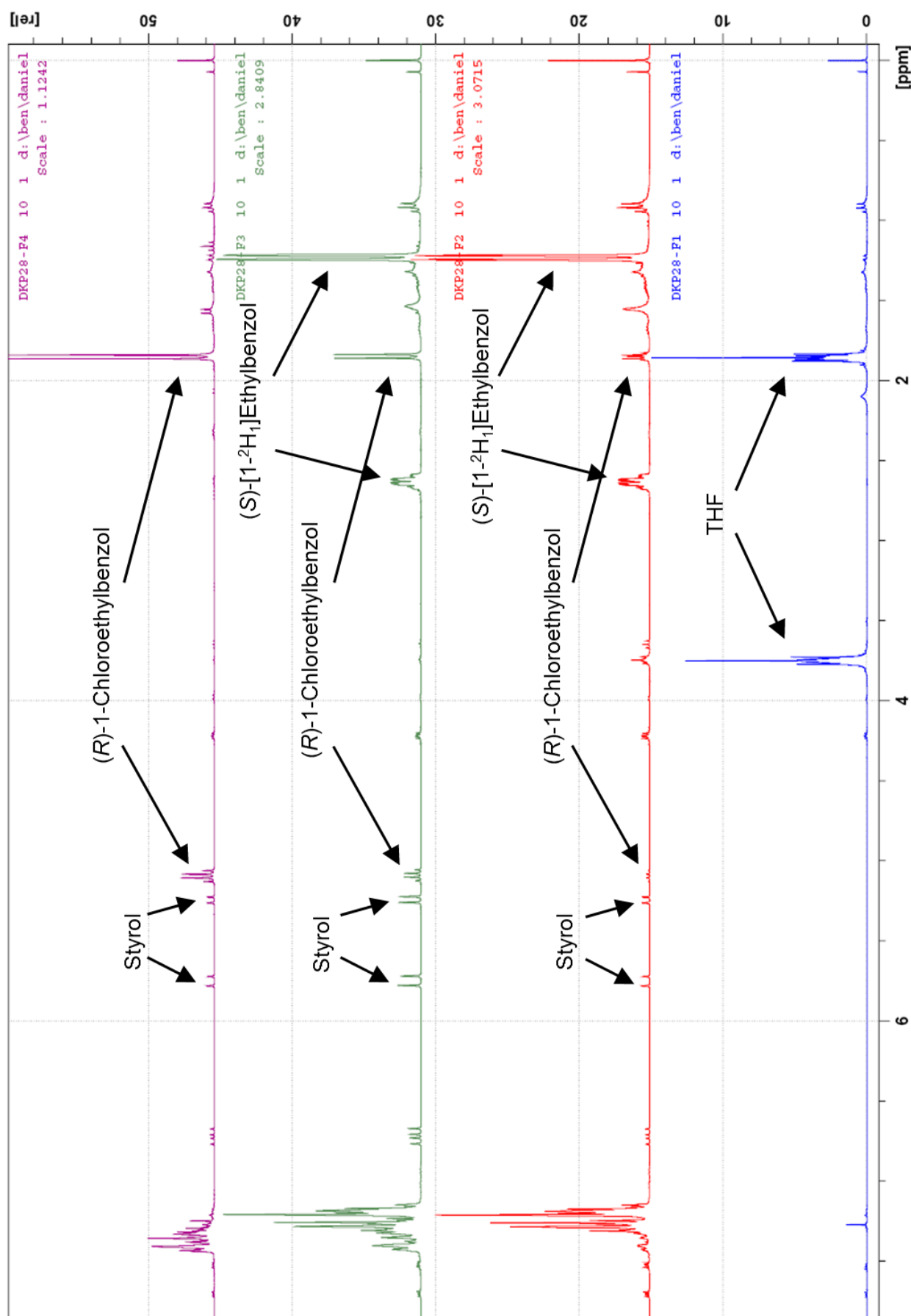


Abb. 29: NMR Spektren der Fraktionen die durch die Destillation des Reaktionsgemischs von (S)-[1- $^2\text{H}_1$]-Ethylbenzol erhalten wurden.

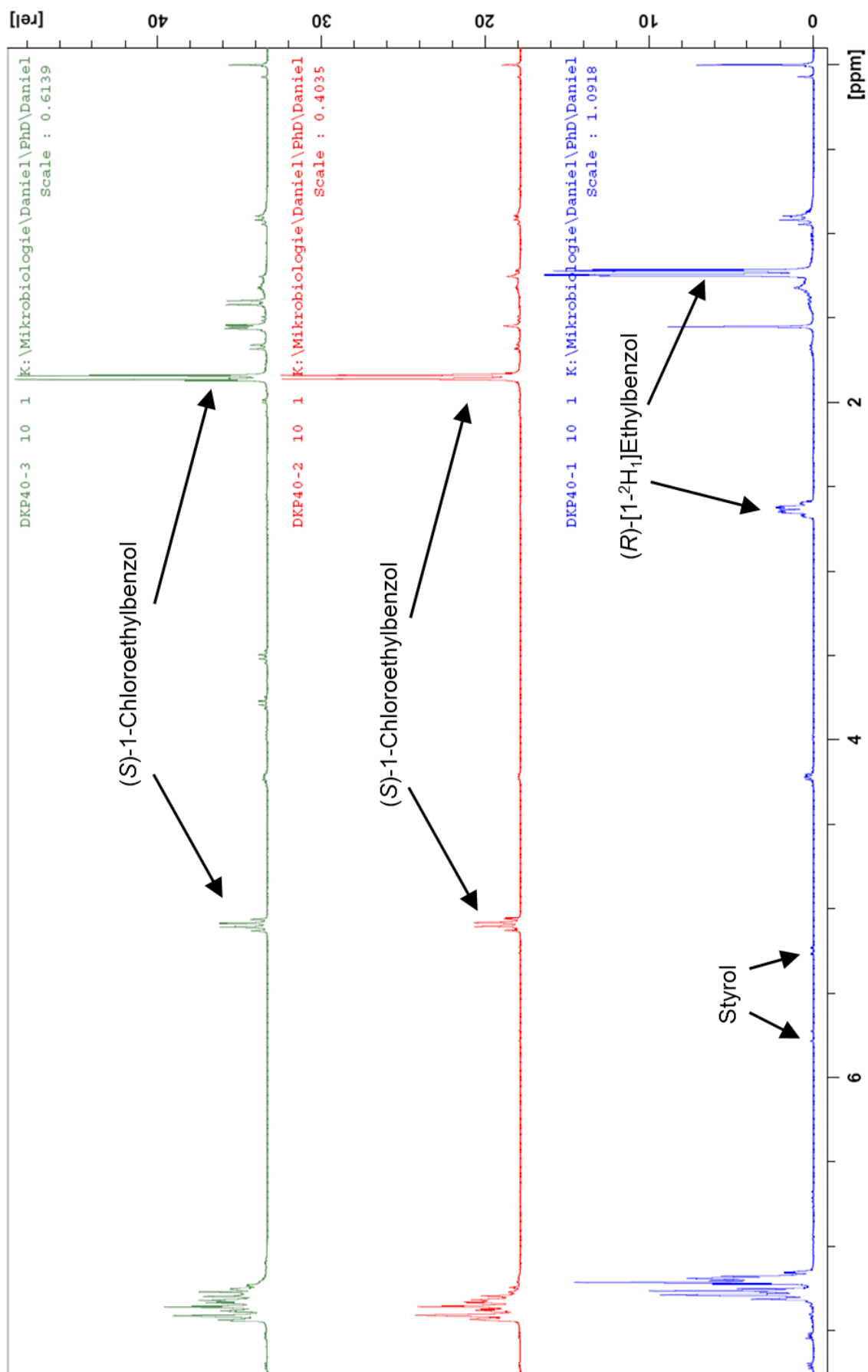


Abb. 30: NMR Spektren der Fraktionen die durch die Destillation des Reaktionsgemischs von *(R)*-[1-²H₁]-Ethylbenzol erhalten wurden.

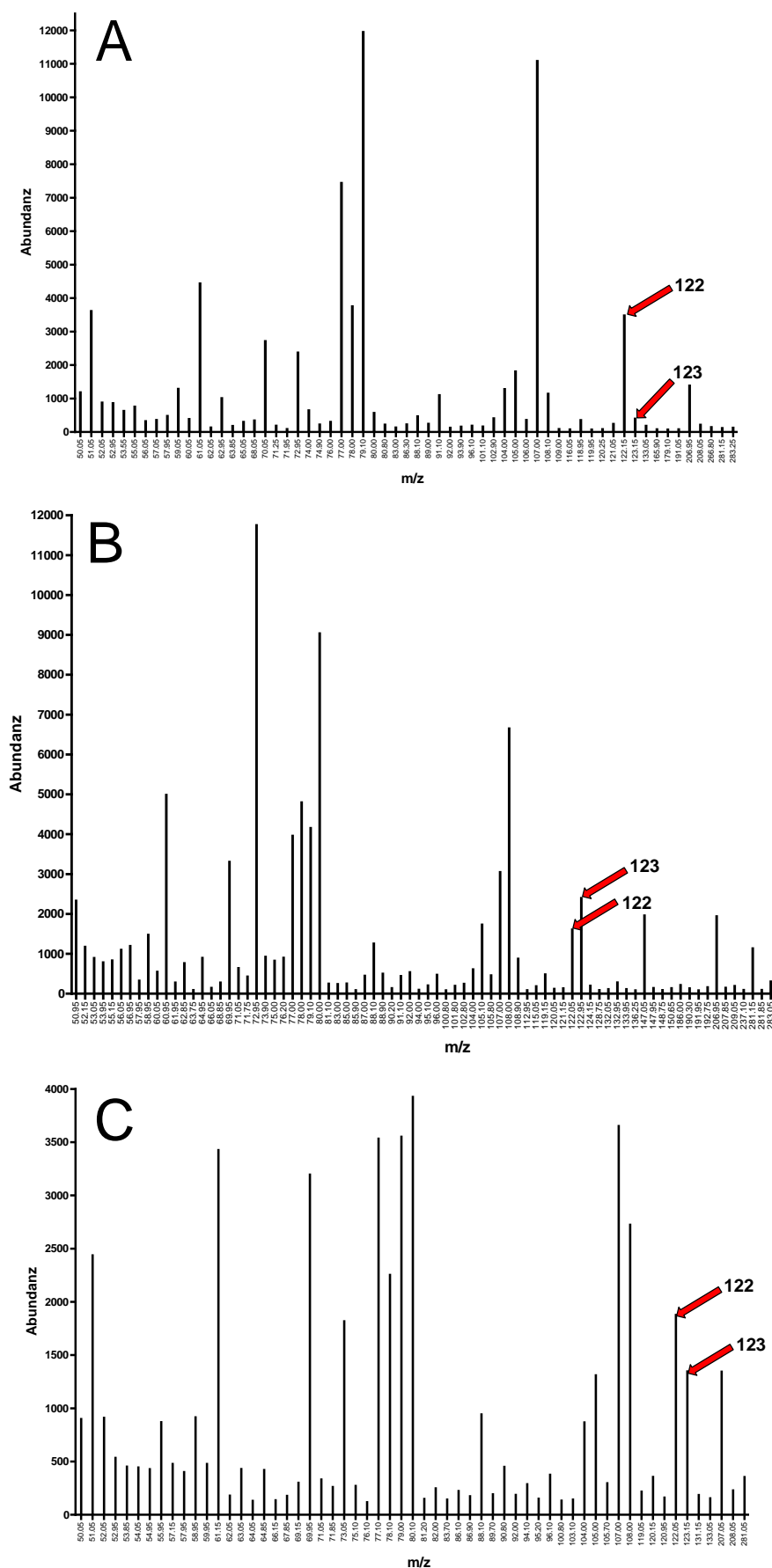


Abb. 31: Massenspektren der Produkte der enzymatischen Umsetzung von Ethylbenzol (A), (R)-[1-²H₁]-Ethylbenzol (B) und (S)-[1-²H₁]-Ethylbenzol (C).

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johann Heider für die Möglichkeit Danken, die Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Das Thema der Promotion war sowohl sehr interessant, als auch sehr anspruchsvoll und abwechslungsreich. Durch die mehr als dreijährige Forschungsarbeit habe ich sehr viel Erfahrung sammeln können. Prof. Heider danke ich vor allem für seine ständige Diskussions- und Problemlösebereitschaft

Mein weiterer Dank gilt dem Zweitgutachter dieser Arbeit und Mitglied meines IMPRS Komitees, Prof. Dr. Wolfgang Buckel. Auch seine ständige Diskussionsbereitschaft und positive Kritik waren sehr hilfreich.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission bzw. meines IMPRS Komitees, Prof. Dr. M. Bölker, Prof. Dr. U.-G. Maier, Prof. Dr. A. Batschauer, Prof. Dr. L.-O. Essen und Prof. Dr. M. Thanbichler.

Für die wissenschaftlichen Kooperationen möchte ich mich bei Prof. Dr. S.-Y. Liu, Dr. Corina Hagel, Dr. Uwe Linne, Dr. Stefan Baumeister, Jan Bamberger, Jonathan Marshall, Gregory Harlow und Aleksander Salwinski bedanken. Ein besonderer Dank gilt Dr. Maciej Szaleniec, dessen wissenschaftliche Kooperation sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Auch seine ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe weiß ich sehr zu schätzen. Dziękuję bardzo, Maciek! Außerdem möchte ich mich recht herzlich bei Dr. P. Friedrich für die große Hilfe bei der Durchführung der chemischen Synthesen bedanken. Seine Unterstützung hat entscheidend zum Gelingen dieser Experimente beigetragen.

Ein großes Dankeschön gilt natürlich meinen Kollegen der Arbeitsgruppen Heider, Buckel und Bremer die dafür gesorgt haben, dass ich den Laboralltag und unzählige wissenschaftliche Konferenzen gerne in Erinnerung behalte und auf viele Ereignisse mit Wehmut zurückblicke. Vielen Dank an euch!

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie die mich nicht nur während des Studiums sondern auch während meiner Doktorarbeit immer unterstützt und an mich geglaubt hat. Vielen Dank an euch!

Nicht zuletzt möchte ich natürlich meiner Freundin Agnieszka für die große Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken. Deine Unterstützung sowohl in wissenschaftlicher als auch in privater Hinsicht hat vielleicht am meisten zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Kocham cię, kochanie moje!

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Daniel Horst Knack
Geburtsdatum	23. Oktober 1982
Geburtstort	Marburg/Lahn

Ausbildung und beruflicher Werdegang

10/2009 – 03/2013	Promotion am Lehrstuhl für mikrobielle Biochemie bei Prof. Dr. Heider, Philipps Universität Marburg. Thema: Funktion und Mechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase. Mitglied in der „International Max-Planck-Research School for Molecular, Cellular and Environmental Microbiology“, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg
10/2007 - 9/2009	Master-Studium „Molecular and Cellular Biology“ an der Philipps Universität Marburg. Fachmodule: Zellbiologie, Molekulare Mikrobiologie, Mikrobielle Ökologie. Masterarbeit bei Prof. Dr. Heider, Philipps Universität Marburg. Thema: Die Zweikomponenten-Sensorkinasen TdiS, EdiS und AdiS des anaeroben Ethylbenzolabbaus in <i>Aromatoleum aromaticum</i> .
10/2004 - 6/2007	Bachelor-Studium „Biology“ an der Philipps Universität Marburg. Fachmodule: Zellbiologie, Mikrobiologie und Genetik. Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie bei Prof. Dr. U.-G. Maier, Philipps Universität Marburg. Thema: Die Diatomee <i>Phaeodactylum tricornutum</i> als Modellorganismus: Konstruktion eines Transfektionsvektors mit einer durch NH_4^+ und NO_3^- regulierbaren Promotor-Terminator Kasette sowie Lokalisationsstudien an Symbiont-spezifischen ERAD Proteinen
07/2003 - 03/2004	Wehrdienst beim 6./Artillerieaufklärungsbataillon 131 in Neustadt (Hessen) als Stabsdienstsoldat und Ausbilder
6/2003	Abitur an der Alfred-Wegener-Schule in Kirchhain

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Funktion und Mechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 30.01.2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Daniel Knack', written in a cursive style.

Daniel Knack